

**Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН**

На правах рукописи

Звычайная Елена Юрьевна

**Филогения рода *Capra* (Bovidae, Artiodactyla):
морфологический и молекулярно-генетический
аспекты**

03.00.08 – зоология

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2008

Работа выполнена в Институте проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Алексей Алексеевич Данилкин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Леонид Миронович Баскин

кандидат биологических наук
Анна Андреевна Банникова

Ведущая организация **Зоологический институт РАН**

Защита состоится **20 мая 2008 г. в 14.00**, на заседании Совета Д 002.213.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, тел/факс: (495) 952-35-84, e-mail: admin@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения общей биологии РАН по адресу: 119071 Москва, Ленинский проспект, 33.

Автореферат разослан **18 апреля 2008** года.

Ученый секретарь Совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций,
кандидат биологических наук

Т.П. Крапивко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Род горных козлов (*Capra*) – спорная в таксономическом и филогенетическом плане группа полорогих копытных. Достаточно отметить, что число выделяемых видов *Capra* колеблется от 1 до 13.

В классической зоологии в качестве критериев для оценки родства форм *Capra* учёные использовали морфологические признаки: окраску животных, форму рогов, строение черепа, зубов и кожных желёз, форму копыт и др. (Linnaeus, 1766; Gray, 1852; Lydekker, 1913; Schwarz, 1935; Ellerman, Morrison-Scott, 1951; Соколов И.И., 1953, 1959; Гептнер и др., 1961; Haltenorth, 1963; Соколов В. Е., 1979; и др.). В зависимости от выбранных критериев изменялись взгляды на состав рода, филогенетические отношения и таксономический ранг отдельных внутривидовых группировок.

Дискретные различия между выделяемыми видами по большинству морфологических признаков отсутствуют, нет и единого вектора их изменчивости. Первое накладывает существенные ограничения на применимость морфологических критериев для различения современных видов, второе препятствует определению направления эволюции признаков и путей расселения древних форм *Capra*. Дополнительные трудности в оценке таксономического статуса представителей рода связаны с отсутствием репродуктивного барьера: в неволе большинство видов легко скрещиваются и дают плодовитое потомство, что позволяет относить их к одному политипическому (биологическому) виду.

В работах последних лет показана перспективность использования методов генофилиетики и геносистематики. В отличие от эволюции морфологических признаков, изменения в последовательностях ДНК носят дискретный характер, поэтому разрешающая способность молекулярных данных выше, и они лучше поддаются количественной обработке. Кроме того, абсолютное большинство закреплённых мутаций являются нейтральными. Такие признаки высвобождены из-под давления отбора и, следовательно, обладают более высокой филогенетической информативностью.

С возрастанием разнообразия признаков, используемых для установления родственных связей, и методов обработки данных увеличивается и количество альтернативных филогенетических гипотез. Система рода подвергается дальнейшим изменениям и по-прежнему остаётся противоречивой (Данилкин, 2005; Павлинов, 2005; Pidancier et al., 2006). Очевидно, что назрела необходимость ревизии взглядов на филогению и таксономию рода *Capra* в свете новых исследований.

Цель работы: Выявить филогенетические связи и реконструировать эволюционную историю рода *Capra*.

Задачи:

1. Исследовать морфологическую изменчивость *Capra*.
2. Провести филогенетический анализ последовательностей митохондриальных и ядерных (Y-хромосома) генов.
3. Обобщить полученные реконструкции в единой филогенетической схеме:
 - сравнить результаты анализа морфологической и молекулярно-генетической изменчивости;
 - восстановить последовательность филогенетических событий;
 - рассмотреть проблемы таксономии рода в свете полученных результатов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые проведён комплексный анализ изменчивости морфологических и молекулярно-генетических признаков представителей рода *Capra*. Методами многомерной статистики подробно исследована изменчивость краниальных признаков, проведена оценка их вклада в распознавание видов. Впервые получены и включены в международную базу данных GenBank нуклеотидные последовательности интрона гена SRY 5 видов *Capra*. Определены последовательности и проведён филогенетический анализ гена цитохрома b и левого домена контрольного региона мтДНК. Оценена разрешающая способность и информативность генетических маркёров при определении границ и порядка дивергенции внутриродовых группировок.

Полученные результаты являются вкладом в разработку филогенетической системы рода *Capra* и раскрывают, с одной стороны, важное значение гибридизации и процесса интрогрессии мтДНК в становлении видов, с другой – распространённость этих явлений.

Сведения по морфологической и молекулярно-генетической изменчивости видов *Capra* могут быть использованы для решения проблем таксономии рода. Полученные данные имеют принципиальное значение при разработке программ по сохранению генетического разнообразия редких и охраняемых видов, подвидов и популяций *Capra*, внесённых в Красные книги МСОП, Российской Федерации, её регионов и сопредельных государств. Сделанные в работе выводы позволят также более осознанно подойти к решению проблем управления и охраны промысловых видов *Capra*.

Наличие «чужеродной» мтДНК в популяциях *C. sibirica*, полученной, вероятно, в результате гибридизации с домашними животными, свидетельствует об уязвимости генофондов диких видов. Очевидно, что необходимо принять меры и по ограничению такого рода воздействия хозяйственной деятельности человека.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на 7 международных и всероссийских конференциях и совещаниях, в том числе: «FEBS Forum for Young Scientists» (Praga, 2004), «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых учёных» (Москва, 2004, 2006), «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (Москва, 2005), «Териофауна России и сопредельных территорий» (Москва, 2007), «Млекопитающие горных территорий» (Нальчик, 2007), «Молекулярно-генетические основы сохранения разнообразия млекопитающих Голарктики» (Черноголовка, 2007). Материалы исследования были доложены и обсуждались в рамках семинара «Видообразование» кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ (Москва, 2007) и на объединённом коллоквиуме лаборатории экологии и функциональной морфологии высших позвоночных, кабинета методов молекулярной диагностики, лаборатории микроэволюции млекопитающих, научно-информационного центра кольцевания птиц, лаборатории поведения и поведенческой экологии млекопитающих ИПЭЭ РАН 28.02.2008.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ (из них 1 – в журнале из списка ВАК, 6 – в других научных изданиях, 4 – тезисы докладов).

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 156 страницах, содержит 35 рисунков и 20 таблиц. Список цитируемой литературы включает 217 наименований.

Благодарности. Автор глубоко признателен за помощь научному руководителю д.б.н., проф. А. А. Данилкину. Искренняя благодарность д.б.н. М. В. Холодовой, к.б.н. И. Г. Мещерскому и к.б.н. П. А. Сорокину за поддержку при проведении исследований в кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, ценные замечания в ходе написания диссертации и постоянное внимание к моей работе. Особую благодарность хочу выразить к.б.н. М. В. Кузнецовой за помощь в освоении методов молекулярной

диагностики, а также к.б.н. А. Ю. Пузаченко за неоценимую помощь в статистической обработке краниологического материала, описании методов, результатов, а также их трактовке. Я благодарна также коллективам териологического отдела Зоологического Музея МГУ и Зоологического Института РАН за предоставленную возможность краниометрических исследований; к.б.н. А.Е. Субботину, д.б.н. И.Я. Павлинову, к.б.н. Н.А. Формозову, к.б.н. П.И. Вейнбергу, В.С. Лебедеву за помощь и ценные советы в процессе сбора, обработки и обсуждения материала; московскому охотничьему клубу «Сафари», а также к.б.н. О.И. Подтяжкину, О.А. Шемякину, С.А. Тишкевичу, В.И. Колесникову, к.б.н. С.А. Плаксе, к.б.н. Д.Г. Медведеву, д.б.н. А.Б. Савинецкому, Н.А. Пояркову, к.б.н. В.С. Лукаревскому, А. Лукьянову и другим зоологам, охотоведам, егерям и охотникам, оказавшим помощь в сборе образцов.

Работа проведена в рамках программ ОБН РАН «Динамика генофондов популяций животных и растений» и «Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами», поддержана грантами РФФИ № 04-07-01240-А и № 06-04-49575 и НШ 4534.2006.4.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Краткая характеристика рода *Capra*

Приведены литературные сведения о происхождении рода, родственных связях, положении в системе, ископаемых находках плейстоценовых и голоценовых горных козлов и историческому изменению ареала. Дана краткая, в том числе морфологическая, кариологическая и экологическая, характеристика представителей рода.

Глава 2. Подходы, используемые в систематике рода *Capra*, и наиболее распространённые таксономические и филогенетические построения

Описаны основные методологические подходы в систематике *Capra* (морфологические, гибридологический, молекулярно-генетические и др.) и изложена история классификации рода. Обоснована необходимость тщательного анализа и сопоставления всех имеющихся данных по морфологической, молекулярно-генетической изменчивости видов рода и палеонтологических материалов. Опираясь на видовые названия, мы отталкивались от наиболее распространённой среди отечественных зоологов системы рода (Гептнер и др., 1961; Соколов В. Е., 1979; и др.), включающей 8 морфологических видов горных козлов: пиренейского (*C. pyrenaica*), альпийского (*C. ibex*), безоарового (*C. aegagrus*), нубийского (*C. nubiana*), западнокавказского (*C. caucasica*), восточнокавказского (*C. cylindricornis*), сибирского (*C. sibirica*) и винторогого (*C. falconeri*). Кроме того, в исследование молекулярно-генетической изменчивости рода включен домашний козёл (*C. hircus*).

Глава 3. Материалы и методы

Материалы и методы изучения морфологической изменчивости *Capra*

В основу этой части работы легли коллекционные материалы зоологического музея МГУ (ЗМ МГУ) и Зоологического института РАН (КЗМАН). Всего измерено 373 черепа самцов и самок разных возрастных групп (табл. 1). С каждого черепа снимали 80 параметров, включая 30 стандартных промеров, 42 – оригинальных и 8 качественных признаков.

Таблица 1. Исследованный краниометрический материал. Половой и возрастной состав

Вид	Всего	0–1,5 года (I группа)	2–3,5 года (II группа)		4–4,5 года, (III группа)		5–7,5 лет (IV группа)		8–10,5 лет (V группа)		11–16 лет (VI группа)	
		♀♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
<i>C. aegagrus</i>	73	7	7	6	8	7	18	14	1	3	1	1
<i>C. sibirica</i>	117	2	2	6	5	7	31	41	1	14	3	5
<i>C. ibex</i>	20	–	–	–	1	1	3	4	–	7	–	4
<i>C. caucasica</i>	74	4	4	15	1	7	9	19	3	10	–	3
<i>C. cylindricornis</i>	59	2	4	10	3	5	10	14	–	10	–	1
<i>C. falconeri</i>	30	6	3	3	3	1	5	5	1	2	–	1

Обработку данных проводили в программе STATISTICA 7.0, с использованием пакетов программ SPSS 13.0, NCSS и SYSTAT 11.

Анализ включал два независимых, методологически разных подхода. На первом этапе для всего массива данных был применён дискриминантный анализ в целях выявления различий между априорно заданными группами объектов (так называемой обучающей выборкой) по многим переменным одновременно. Другими словами, решалась задача различения отдельных групп с использованием заданного набора дискриминантных переменных. Кроме того, выясняли, насколько хорошо эти переменные позволяют провести различие и какие из них оказываются наиболее информативными. На втором этапе выборка черепов половозрелых животных (старше 5 лет) была протестирована на предмет изменчивости краниометрических признаков (без промеров роговых чехлов и костных стержней) с помощью методов многомерного шкалирования и кластерного анализа, исходя из предположения о стохастической изменчивости признаков (без предварительного деления на группы). И лишь затем полученные классификации были сопоставлены с априорными.

Для отбора информативных дискриминантных переменных был использован пошаговый дискриминантный анализ. Значимость признаков определяли по величине F-критерия (исходя из условия, что переменная с наибольшим значением F-критерия даёт наибольший вклад в различие). Далее отобранное подмножество наиболее информативных (значимых) переменных использовали для вычисления дискриминантных функций. Затем было получено распределение группировок в пространстве двух первых канонических переменных. Такая общая схема анализа была применена дважды: для оценки возрастной изменчивости (в роли группирующей переменной выступала принадлежность к той или иной возрастной группе) и собственно межвидовой изменчивости. Для сопоставления межвидовых различий были использованы дистанции Махаланобиса.

На втором этапе анализа в роли основного объекта выступали особи, а не половые, географические или заранее заданные таксономические выборки.

Между всеми парами экземпляров вычисляли матрицы расстояний на базе евклидовой дистанции и коэффициента ранговой корреляции Кендала (Sokal, Rohlf, 1981). В случае первой метрики расстояние обобщенно отражает различия между особями по размерам, второй – согласованность изменчивости отдельных промеров, т.е. изменчивость формы или пропорций (Абрамов, Пузаченко, 2006). Далее находили минимальное число линейнонезависимых виртуальных переменных, наилучшим образом воспроизводящих взаимоположение особей, зафиксированное в матрицах дистанций. Задача «снижения размерности» (Айвазян и др., 1989), решалась с использованием непараметрического метода неметрического многомерного шкалирования (МШ) (Shepard 1962, Davison, Jones, 1983) и исходя из гипотезы об обратной мультипликативной зависимости величины «стресса» от числа осей

многомерного шкалирования ОМШ (Пузаченко, 2001; Куприянова и др., 2003). В тексте работы ОМШ, воспроизводящие изменчивость размеров обозначаются как E1, E2 ... Em., а изменчивость формы – K1, K2 ... Km.

Используя корреляционный анализ (ранговая корреляция Спирмена, r_s), непараметрический тест Краскела-Уоллиса (непараметрический аналог одномерного дисперсионного анализа) и обобщенную модель дисперсионного анализа (GLM), оценивали вклад различных факторов (пола, возраста и географического происхождения экземпляра) в изменчивость ОМШ. Статистически значимую компоненту изменчивости, связанную с возрастом, «отфильтровывали» из ОМШ, применяя PLS регрессию (Haenlein, Kaplan, 2004).

Иерархическую классификацию особей проводили методом невзвешенного группового среднего (UPGMA) с использованием евклидовой метрики (Уиллиамс, Ланс, 1986; Айвазян и др., 1989) и ОМШ в качестве переменных. Качество иерархической классификации, оценивали по величине коэффициента корреляции Пирсона для исходных евклидовых дистанций между особями и рассчитанных на основе положения особей на дендрограмме («кофенетическая корреляция», КК). При необходимости, с целью максимизации КК, проводили предварительное ранжирование ОМШ (выравнивание «весов» для всех осей). Принадлежность «висячих» кластеров уточняли с помощью дискриминантного анализа. Помимо иерархической модели применяли различные варианты неиерархической классификации: дихотомию¹ (Пузаченко Ю. и др., 2004), k -средних (Hartigan, Wong, 1979), метод нечетких множеств (Kaufman, Rousseeuw, 1990).

Результаты морфологической классификации сопоставляли с априорными гипотезами разделения особей на виды или географические выборки методом перекрестных таблиц. При проверке нулевой гипотезы об их независимости использовали критерий согласия χ^2 Пирсона (Sokal, Rohlf, 1981).

Материалы и методы изучения молекулярно-генетической изменчивости *Capra*

Материалом для данной работы послужили заспиртованные образцы мышечной ткани 5 видов рода *Capra* (коллекция тканей животных для генетического анализа ИПЭЭ РАН). В качестве маркёров при проведении филогенетического анализа использовали ген цитохрома b, левый домен контрольного региона мтДНК и два фрагмента интрона гена SRY, локализованного в Y-хромосоме.

Экстракцию ДНК осуществляли стандартными методами с использованием протеиназы К и смеси фенол-хлороформа (Sambrook et al., 1989) или набором «Diatom DNA Prep 200» («Изоген», Москва). Одна последовательность фрагмента D-петли *C. aegagrus* (39) получена из костного материала (коллекция ЗММГУ, коллекционный номер – S-48300) с помощью методики для выделения ДНК из костных и роговых тканей (Холодова, 2001) и набора реактивов PCR Purification Kit (QIAGEN). ДНК успешно выделена из 48 образцов (табл. 2). Амплификацию гена цитохрома b осуществляли с помощью праймеров GLU и R, контрольного региона – PRO и DLC (Ozawa et al, 1997; Холодова и др., 2001). Фрагменты гена SRY получили, используя оригинальные праймеры: SRYL1 (5' – GCA TGT AGC TCC AGA ATA TTT CAC T – 3'), SRYH1 (5' – ATA AAT C(T/C)(G/A) T(G/A)A GGC AAA CTT GAA A – 3'), SRYL2 (5' – TGC TTC TGC TAT GTT CAG AGT ATT G – 3') и SRYH3 (5' – GCA ATT TAC AAA GAG GTG GAA AGT A – 3'). ПЦР проводили в автономном амплификаторе «Терцик», последовательности фрагментов определяли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 с наборов реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Всего получено 42

¹ Расчеты проведены в программе Fracdim ver.1.9 (Пузаченко Ю., Алещенко, 2004)

фрагмента гена цитохрома *b* мтДНК (табл. 2), 28 почти полных последовательностей этого гена, 19 последовательностей контрольного региона мтДНК и 37 – гена SRY.

Таблица 2. Исследованный молекулярно-генетический материал*

Вид	Количество образцов из которых успешно выделена ДНК	Количество последовательностей, включённых в филогенетический анализ			
		фрагмент гена цитохрома <i>b</i> длиной 392 н.п.	фрагмент гена цитохрома <i>b</i> длиной 1128 н.п.	участок контрольного региона мтДНК длиной 402 н.п.	фрагмент гена SRY Y-хромосомы длиной 1832 н.п.
<i>C. sibirica</i>	16	13 (12)	12 (11)	1 (1)	14 (14)
<i>C. caucasica</i>	9	8 (8)	8 (8)	9 (9)	7 (7)
<i>C. cylindricornis</i>	9	10 (8)	8 (6)	5 (5)	8 (8)
<i>C. aegagrus</i>	8	7 (2)	13 (7)	4 (3)	3 (3)
<i>C. falconeri</i>	6	10 (6)	3	1 (1)	5 (5)
<i>C. pyrenaica</i>	–	6	6	–	–
<i>C. ibex</i>	–	2	1	–	–
<i>C. hircus</i>	–	7	6	1	1

* В скобках указано количество последовательностей, полученных нами

Кроме того, в анализ включены нуклеотидные последовательности соответствующих фрагментов из международной базы данных GenBank. В качестве внешних групп при построении филогенетических деревьев выбраны последовательности голубого барана (*Pseudois nayaur*), горала (*Nemorhaedus goral*) и архара (*Ovis ammon*). Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли вручную с помощью программы Bioedit (Hall, 1999). Исследование вариативности последовательностей, оценка нуклеотидного разнообразия (внутривидовые дистанции π), вычисление межвидовых дистанций (Net distance) и построение филогенетических деревьев методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) осуществлены с использованием двухпараметрической модели Кимуры в программе MEGA 3.1 (Kimura, 1980; Saitou, Nei, 1987; Kumar et al., 2004). Генетическая дистанция между группировками (Net distance) вычислена по алгоритму $D = d_{XY} - (d_X - d_Y)/2$, где d_{XY} – средняя генетическая дистанция между гаплотипами группировок X и Y, а d_X , d_Y – средняя дистанция между гаплотипами в пределах этих группировок. Метод максимальной экономии (парсимонии, Maximum Parsimony) реализован при помощи пакета программ PAUP 4.10 (Swofford, 2000), метод наибольшего правдоподобия (Maximum Likelihood) – программы METAPIGA (Lemmon, Milinkovitch, 2002). В качестве статистического критерия при построении филогенетических деревьев применялся метод бутстрепа (Felsenstein, 1985). Значимость реконструкций оценивалась методом бутстрепа с использованием 1000 реплик. Построение медианных сетей гаплотипов выполнено в программе Network (Bandelt et al., 1999).

Глава 4. Анализ морфологической изменчивости представителей рода

Информативность краниальных признаков (дискриминантный анализ)

Бимодальное распределение всего массива краниометрических данных служит формальным основанием для раздельного анализа самцов и самок. Дистанция

Махаланобиса, разделяющая выборки самцов и самок равна 20,4. Различия между выборками достоверны ($p < 0,01$).

Самки и самцы обнаруживают наибольшую возрастную изменчивость в 0–3,5 лет и заметно отличаются по краниальным признакам от половозрелых особей. При этом дискриминантный анализ не позволяет дифференцировать старшие возрастные группы. Таким образом было принято решение о включении в последующий анализ экземпляров четырёх лет и старше.

Для самцов выбран 31 информативный признак (рис. 1). Семь из них связаны с формой рогового чехла: максимальный диаметр при основании рога (68), длина окружности при основании (70), максимальное расстояние между рогами (75), длина четырёх сегментов (77), расстояние между концами рогов (76), длина рога по верхнему краю (72), расстояние от основания до конца рога – хорда (73). Для самок отобрано 29 информативных признаков, 5 из них – промеры рогов (68, 70, 75, 72, 73). Достоверность различения группировок самок по краниальным признакам в большинстве случаев несколько ниже, чем самцов.

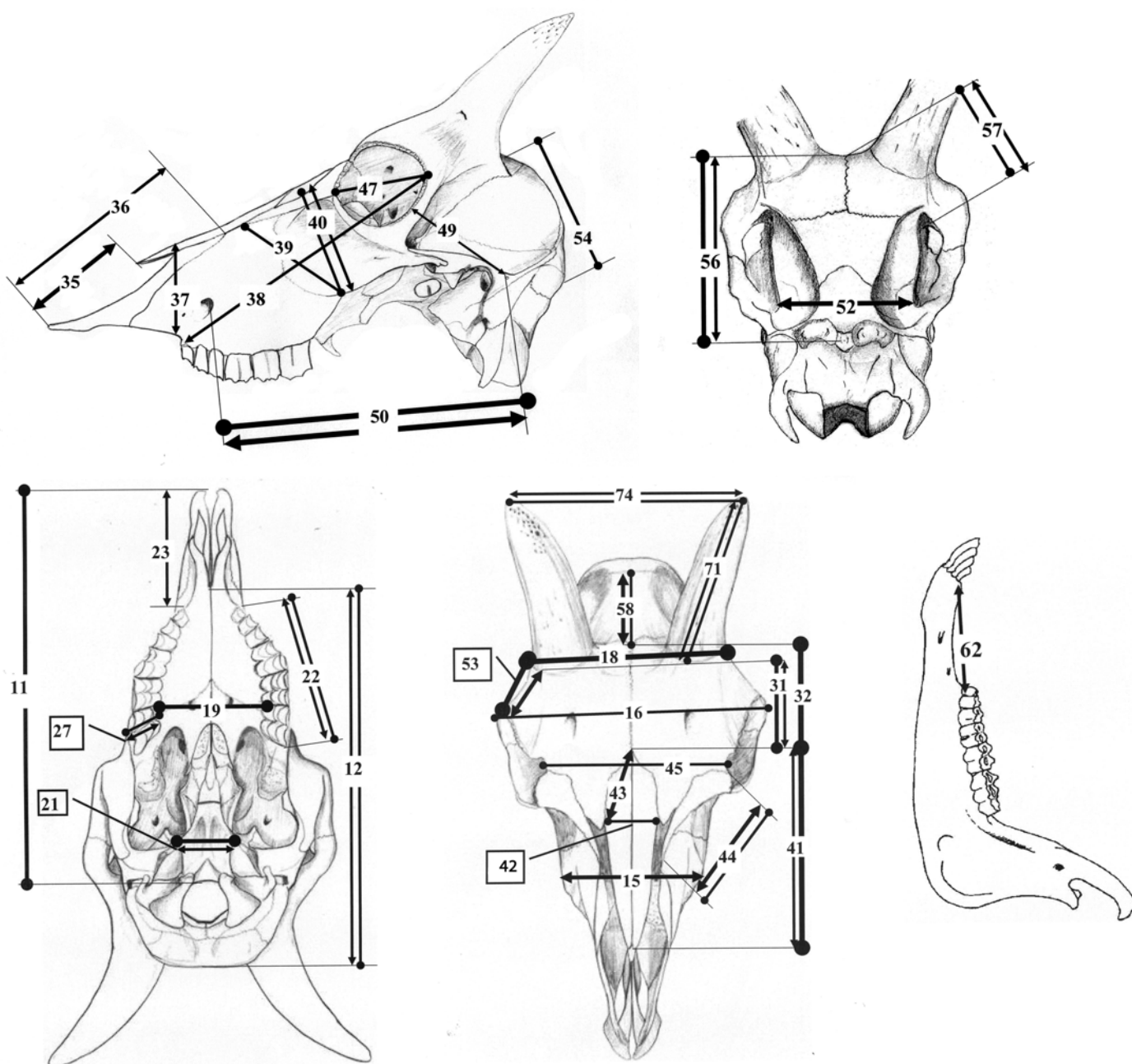


Рис. 1. Значимые краниометрические признаки для представителей *Sarpa*

Линиями со стрелками обозначены признаки для самок, линиями с кругами – для самцов. Толщина линии отражает информативность признака и увеличивается с возрастанием F фактора

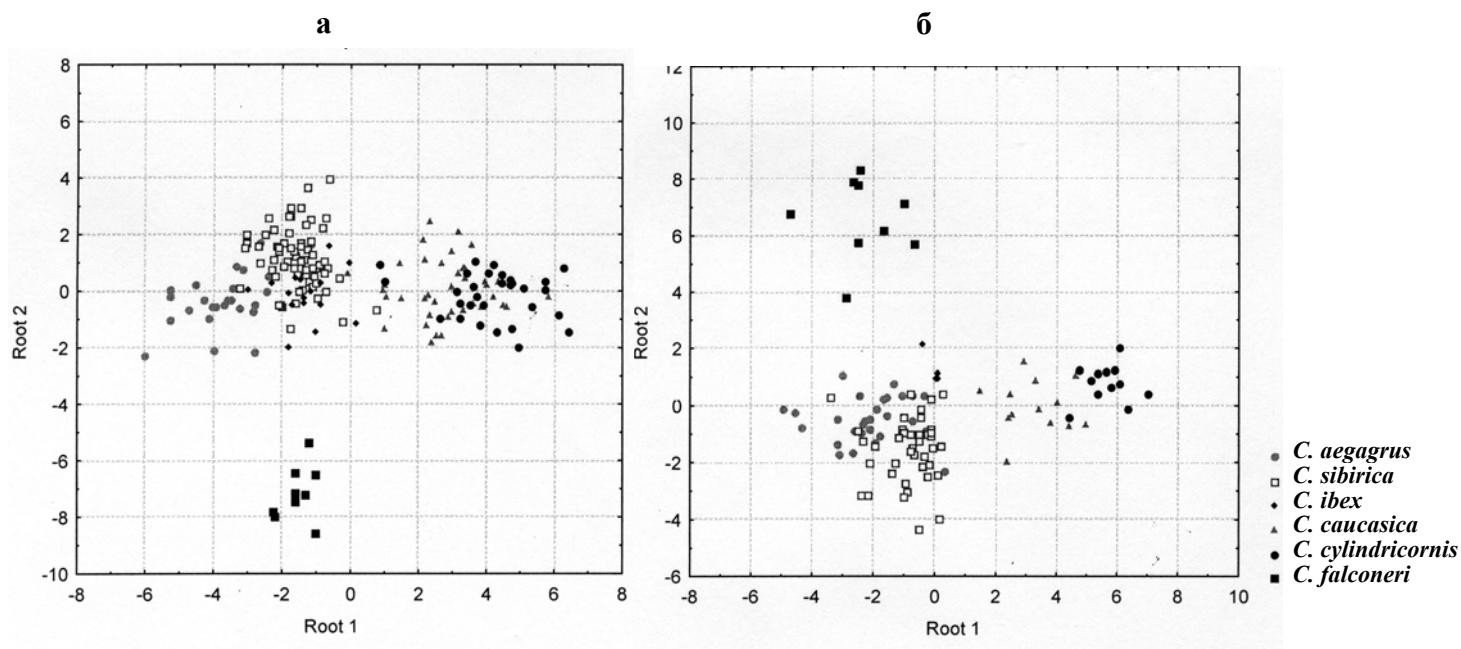


Рис. 2. Распределение экземпляров *Capra* в пространстве двух первых осей дискриминантного анализа

В анализ включены краниальные признаки самцов (а) и самок (б) с 4-х летнего возраста. Пояснения см. в тексте

Использование значимых признаков позволяет максимизировать различия между видами, а исключение из анализа остальных признаков должно способствовать избавлению от случайных искажений дистанций. Однако полностью избежать подобного «шума» нет возможности хотя бы потому, что для различения каждой пары видов *Capra* существует своя совокупность значимых признаков, и это необходимо учитывать, анализируя все виды вместе. Некоторые признаки встречаются при попарном сравнении наиболее часто, а следовательно, являются значимыми для большинства видов. Большинство таких признаков связано с формой рогов. С другой стороны, встречаются видоспецифичные признаки: *C. falconeri*, например, от большинства других видов отличается длиной зубного ряда верхней челюсти (22), расстоянием между крайними боковыми точками при основании костного стержня рогов (18), расстоянием от основания рога до глазницы (53) и т. д.

Результаты, полученные отдельно для априорных таксономических группировок самцов и самок, совпадают. Обнаружена достоверная корреляция между матрицами дистанций Махаланобиса для самок и самцов (коэффициент Спирмена равен 0,88, $p < 0,01$, $n = 15$). Области, занимаемые видами в пространстве двух первых дискриминантных функций, в значительной мере перекрываются (рис. 2). Исключение представляет только винторогий козёл, который оказывается на «значительном расстоянии» от других видов и не образует зоны перекрывания ни с одним из них. Остальные виды сближены в большей степени и образуют две обособленные группы: группу кавказских козлов (*C. caucasica*, *C. cylindricornis*) и группу, включающую *C. sibirica*, *C. ibex* и *C. aegagrus*. Частичное перекрывание наблюдается между *C. caucasica* и *C. cylindricornis*, *C. aegagrus* и *C. sibirica*, а также между *C. ibex* и *C. sibirica*.

Изменчивость краниальных признаков. Априорные и апостериорные классификации (многомерное шкалирование, кластерный анализ)

Изменчивость смешанной выборки самцов и самок *Capra* воспроизводится пятью осями многомерного шкалирования (ОМШ), описывающими размерную изменчивость, и тремя ОМШ, описывающими изменчивость пропорций черепа. В основных компонентах изменчивости (ОМШ E1 и K1) и в ряде других представлена преимущественно

информация о половом диморфизме. Доля дисперсии, определяемая половым диморфизмом в ОМШ составила: в К1 – 89%, в Е1 – 74%, в Е2 – 26% и в Е4 – 16%. Некоторые промеры изменяются в течение всей жизни животного, что нашло свое отражение во вкладе возрастного фактора в дисперсию основных ОМШ – Е1 (24.5%) и К1(30%). Совместные эффекты факторов «пол» и «возраст» не выявлены. На фоне индивидуальной изменчивости, как и предполагалось, «географический фактор» проявляется относительно слабо: от 48% в дисперсии ОМШ К2 до 8% в Е5 (в среднем по всем осям – 25%). В целях исключения эффектов, связанных с половым диморфизмом, изменчивость самцов и самок и в данном случае анализировали отдельно.

Самцы. Изменчивость размеров черепа самцов удовлетворительно описывается 3 ОМШ, изменчивость пропорций – 4 ОМШ. Их линейная комбинация воспроизводит от 34 до 94% изменчивости промеров. Большинство промеров коррелируют только с ОМШ Е1 и К1.

На верхнем уровне классификации все особи разбиваются на две группы (рис. 3а). В кластер I вошли *C. caucasica*, *C. cylindricornis*, *C. falconeri*, в кластер II – *C. aegagrus*, *C. sibirica*, *C. ibex*. На втором уровне дифференцируются самцы *C. falconeri* (кластер Ia). Дальнейшее ветвление дендрограммы не позволяет установить определенное соответствие с априорной классификацией. Результат применения неиерархической классификации (к-средних, метод размытых множеств) на уровне двух групп демонстрирует картину разбиения, сходную с описанной выше. Результат дихотомической классификации отличается тем, что в нем особи *C. sibirica* разделяются на два кластера.

Сравнение дифференциации морфологических кластеров, полученных при иерархической и дихотомической классификациях, выявило их общее подобие, но для дихотомической классификации медианное значение критерия Фишера было выше (37.5), чем для иерархической (22.7). С другой стороны, иерархическая классификация лучше соответствовала априорной классификации.

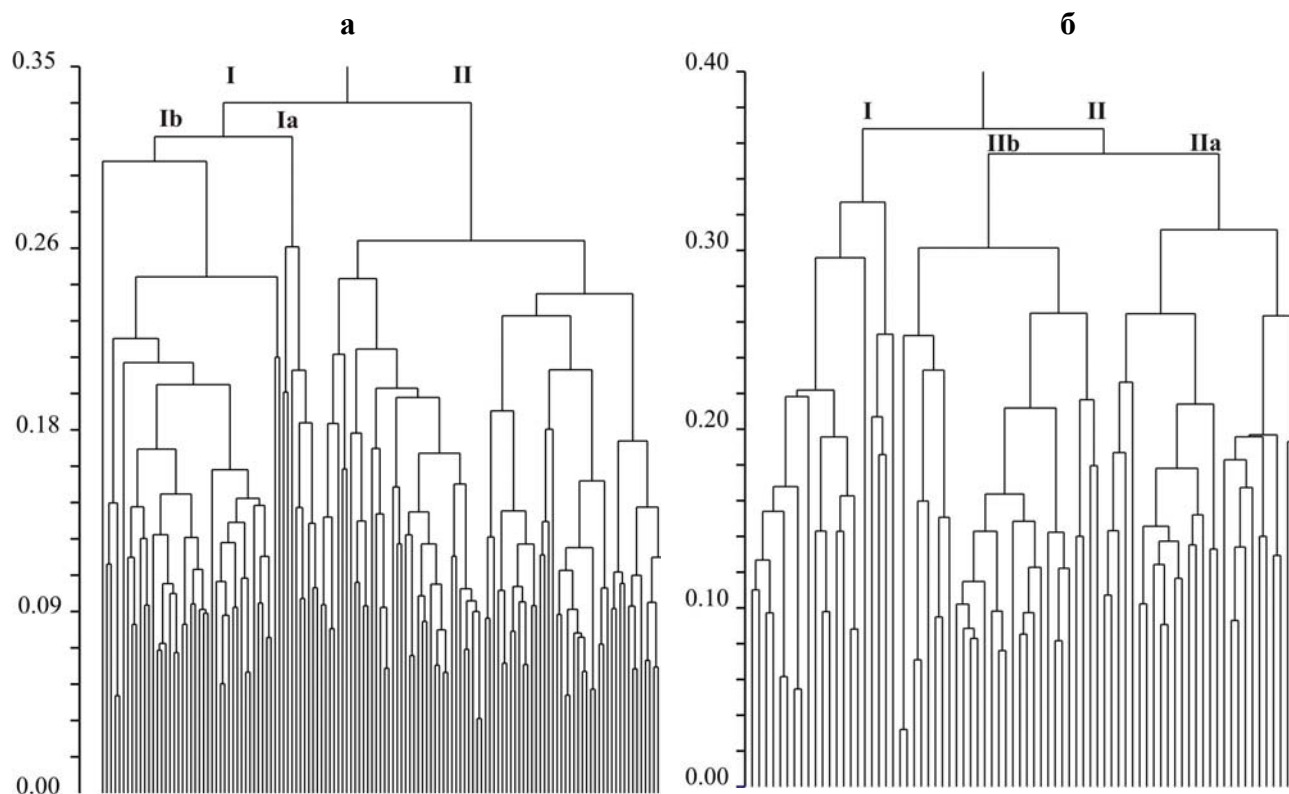


Рис. 3. Дендрограммы иерархической классификации (метод UPGMA, метрика – дистанция Евклида) самцов (а) и самок (б) *Capra* по краниальным признакам

Пояснения см. в тексте

Результат анализа классификаций выборки самцов позволил сформулировать рабочую гипотезу о том, что не существует способа отразить таксономию всей группы в рамках одной морфологической классификации, или (альтернатива) априорная таксономическая классификация не однозначно отражает морфологическую изменчивость черепа. Для проверки была выбрана иерархическая классификация. Выбор осуществляли на основе формального критерия её лучшего соответствия априорной таксономической классификации.

По схеме, аналогичной описанной выше, независимо была исследована изменчивость в кластерах I и II, а затем отдельно – группы кавказских козлов и *C. sibirica*. При любых видах классификации кластера I от пары *C. caucasica* + *C. cylindricornis* отделялись все особи винторогого козла. В иерархической классификации пара *C. caucasica* + *C. cylindricornis* противопоставлялась *C. falconeri*. В дихотомической классификации «ядро» *C. caucasica* сближалось с *C. falconeri*, а 9 особей образовывали промежуточный кластер между *C. caucasica* и *C. cylindricornis*. В результате анализа изменчивости кластера I априорная гипотеза о морфологической обособленности *C. falconeri* подтвердилась на черепных признаках.

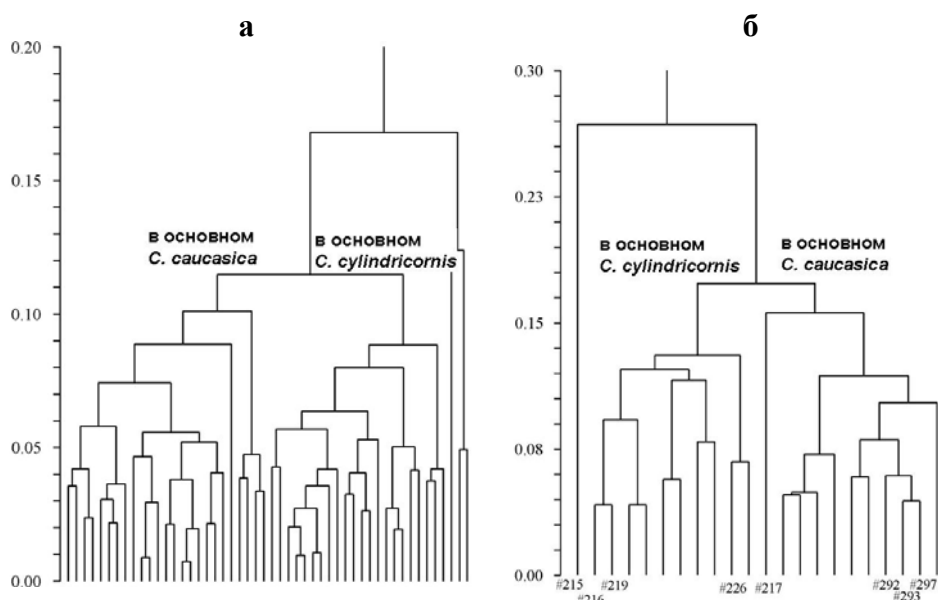


Рис. 4. Дендрограмма иерархической классификации самцов (а) и самок (б) группы *C. caucasica* + *C. cylindricornis*

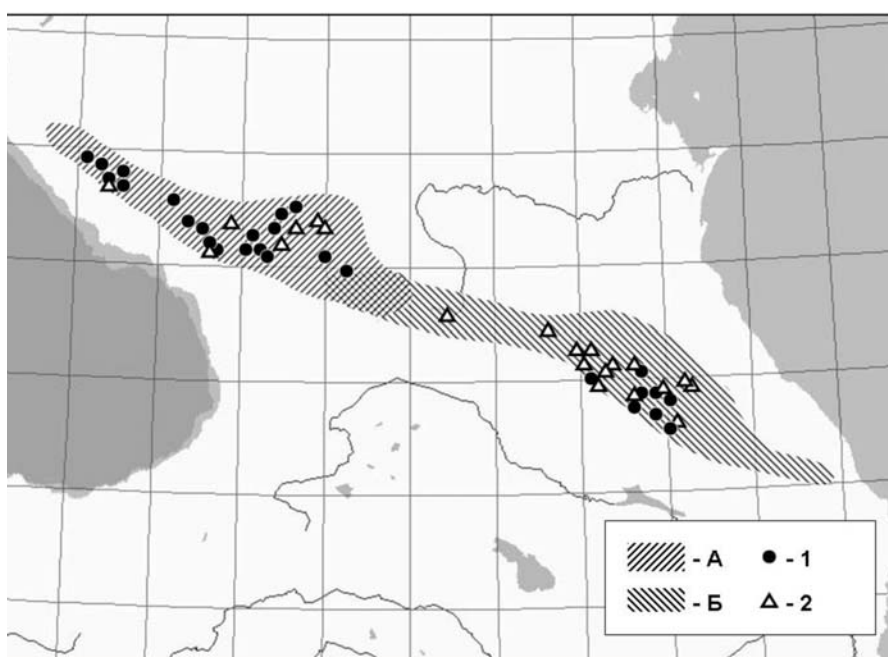


Рис. 5. Географическое распределение совокупной выборки самцов и самок, отнесенных к *C. caucasica* (1) и *C. cylindricornis* (2) по результатам иерархической классификации

Ареал *C. caucasica* (А) и *C. cylindricornis* (Б) по: Гептнер и др., 1961 и Соколов, Темботов, 1993

Иерархическая классификация пары *C. caucasica* + *C. cylindricornis* разбивает выборку на две группы (рис. 4а, 5). При этом относительно априорной классификации неверно определёнными оказываются 10 особей (20%). Близкий результат был получен и при дихотомической классификации (12 особей, 24%). Морфологическая дифференциация, порождаемая в рамках иерархической классификации, в среднем выше, чем в случае дихотомической.

Иерархическая классификация кластера II выявила 4 группы особей. Сопоставление с априорной классификацией показало, что две из них соответствуют *C. aegagrus* и *C. ibex*, две другие – *C. sibirica*. При этом евклидова дистанция между группами внутри выборки сибирского козла оказалась на 13% больше, чем между *C. aegagrus* и *C. ibex*. При отдельном анализе *C. sibirica* иерархическая и дихотомическая классификации дали один и тот же результат: выделены две морфологические группы (А, В), которые вполне определенно локализованы географически (рис. 6а, 7).

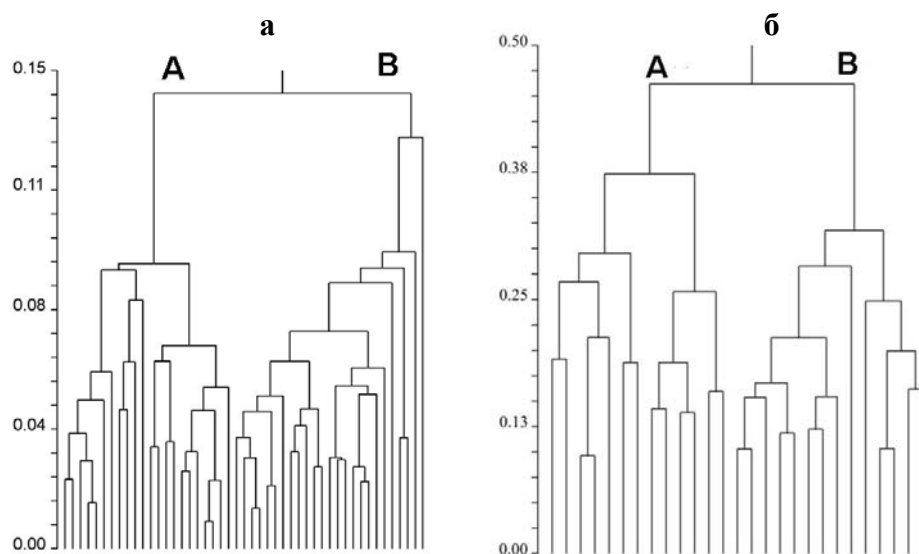


Рис. 6. Дендрограмма иерархической классификации самцов (а) и самок (б) двух (А, В) форм *C. sibirica*

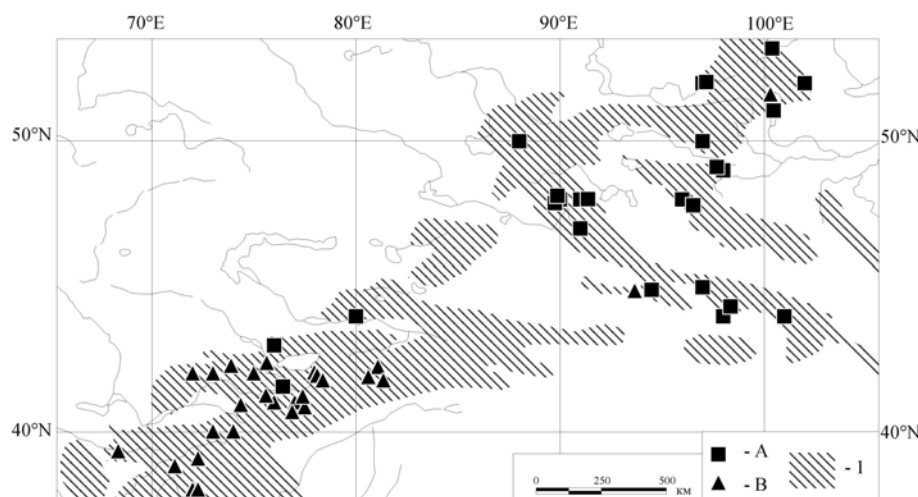


Рис. 7. Географическое распределение совокупной выборки самцов и самок, отнесенных к двум морфологическим формам (А, В) *C. sibirica* по результатам иерархической классификации

1 – ареал *C. sibirica* по: Fedosenko, Blank, 2001

Самки. Результаты исследования краниометрической изменчивости самок *Capra* аналогичны представленным выше для самцов. Изменчивость размеров и изменчивость пропорций черепа самок удовлетворительно описывается 4 ОМШ. Их линейная комбинация в среднем воспроизвела 74% дисперсии промеров (30–94%). Большинство промеров коррелируют только с ОМШ Е1 и К1. Эффект возраста слабо выражен, что, вероятно, отражает половую специфику онтогенеза.

Как и в случае с самцами, результат сравнения иерархических и неиерархических классификаций самок выявил две альтернативы. Неиерархическая классификация порождает группы с существенно более высоким уровнем дифференциации. Разбиение

выборки иерархической классификацией на ее первом уровне лучше соответствует априорной классификации, поэтому она была принята в качестве основы для дальнейшего анализа.

Кластер I базовой иерархической классификации (рис. 3б) формируют *C. aegagrus* и *C. falconeri*. Независимый анализ кластера подтвердил дифференциацию безоарового и винторогого козлов. При этом в выборке присутствуют три «уклоняющиеся» экземпляра.

Кластер IIa на 90% включает самок *C. sibirica*, 1 особь *C. ibex* и 3 – *C. aegagrus*. Учитывая результаты предшествующего анализа выборки безоарового козла и географическую изоляцию *C. ibex*, в дальнейший анализ включили только *C. sibirica*. Иерархическая и неиерархические классификации дали подобный результат, выразившийся в разбиении выборки на два географически дифференцированных морфологических кластера А и В (рис. 6б, 7).

В обоих типах классификаций кластера IIb (*C. ibex* + *C. caucasica* + *C. cylindricornis*) однозначно дифференцировались только три особи *C. ibex*. Выборка кавказских козлов разбилась на две группы, в каждой из которых преобладали (не менее 70%) особи, априорно отнесенные либо к *C. caucasica*, либо к *C. cylindricornis*. Таким образом, возникла необходимость независимого анализа пары *C. caucasica* – *C. cylindricornis*. Иерархическая классификация разбивает выборку на две группы (рис. 4б, 5). При сравнении с априорной классификацией неверно определёнными оказались 6 особей (27%), что хуже показателя для самцов. Дихотомическая классификация дала еще менее значимый результат (32% «неверно» определенных экземпляров). Таким образом независимый морфометрический анализ взрослых самцов и самок показал относительное морфологическое подобие изменчивости черепа у *C. cylindricornis* и *C. caucasica* по сравнению со всеми исследованными таксонами *Capra*.

Изменчивость качественных параметров

Межвидовые различия по исследованным качественным признакам носят частотный, а не диагностический характер. Наибольшие частотные отличия зарегистрированы для *C. falconeri*. У некоторых экземпляров *C. aegagrus*, *C. caucasica* и *C. cylindricornis* обнаружена дополнительная ромбовидная косточка между носовыми и лобными костями. Максимальная частота встреч этой косточки у *C. aegagrus* – в 19 случаях из 62. У *C. cylindricornis* она встречается чаще, чем у *C. caucasica*. Кроме дополнительной косточки, для носовой кости *C. aegagrus* характерна нетипичная форма дистального края. Резко изрезанный край зарегистрирован у 30% особей, что можно объяснить сильной истонченностью края кости.

...

Результаты многомерного анализа краниальных признаков в целом подтверждают правомерность выделения большинства исследованных морфологических видов *Capra*. Изменчивость краниальных признаков представителей рода невозможно описать в рамках единой схемы. Дискриминантный анализ выявил различные совокупности признаков для дифференциации каждой пары видов, а при применении метода многомерного шкалирования для описания правил изменчивости у *Capra* потребовалось несколько моделей. Морфологическая дифференциация между таксонами отражена в разных структурах черепа в зависимости от сравнения той или иной пары видов.

Полученные результаты выявляют недостатки таксономии, выражающиеся в недооценке уровня дифференциации внутри *C. sibirica*, и позволяют наметить «последовательность» направления изменчивости от «примитивного» *C. aegagrus* к «специализированному» *C. falconeri* и наиболее своеобразной форме – *C. cylindricornis* через промежуточные варианты *C. sibirica* и *C. caucasica*.

Глава 5. Филогенетический анализ последовательностей мтДНК

Ген цитохрома b

Количество вариабельных позиций в пределах 1128 н.п. равно 227, что составляет 20,1%, 179 из них информативны для анализа методом максимальной экономии. Среднее количество замен на одну последовательность – 53 транзиции (7, 5, 41) и 4 трансверсии (1, 0, 3).

Филогенетические деревья, построенные по последовательностям гена цитохрома b, при использовании методов ближайшего связывания, максимальной парсимонии и максимального правдоподобия имеют сходную топологию. На древе выявляются минимум 7 отдельных кластеров (рис. 8). Большинство выделенных кластеров имеют очень высокую поддержку, однако их состав и взаимное расположение неоднозначны. Собственные хорошо поддержанные клады образуют *C. sibirica*, *C. nubiana* и группа западноевропейских видов (*C. ibex* и *C. pyrenaica*). Винторогий козёл формирует отдельную ветвь, которая с небольшой поддержкой объединяется с несколькими образцами безоарового и сибирского козлов. Группа кавказских козлов распадается на два кластера, в которые также попадают образцы безоарового козла. Положение *C. aegagrus* на кладограмме в целом не устойчиво.

Наибольшая дистанция отделяет сибирского козла от всех остальных видов *Capra* (табл. 3). Наименьшие генетические расстояния выявлены между *C. aegagrus* и *C. caucasica*, *C. falconeri* и *C. aegagrus*, *C. aegagrus* и *C. cylindricornis*, *C. aegagrus* и *C. hircus*, *C. ibex* и *C. pyrenaica*. Сравнительно невелика дистанция, разделяющая и кавказских козлов. Существенна дистанция между двумя гаплогруппами (А, В) сибирского козла (0.037).

Таблица 3. Межвидовые генетические дистанции (Net distance) для рода *Capra*, вычисленные по последовательностям гена цитохрома b (1128 н.п.) с использованием двухпараметрической модели Кимуры*

S.E. net distance		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	<i>C. sibirica</i>	–	0.0085	0.0078	0.0084	0.0082	0.0080	0.0075	0.0086	0.0087
2	<i>C. falconeri</i>	0.0659	–	0.0053	0.0068	0.0073	0.0062	0.0037	0.0053	0.0055
3	<i>C. cylindricornis</i>	0.0610	0.0264	–	0.0056	0.0062	0.0053	0.0014	0.004	0.005
4	<i>C. pyrenaica</i>	0.0680	0.0414	0.0314	–	0.0043	0.0065	0.0047	0.0061	0.0065
5	<i>C. ibex</i>	0.0668	0.0447	0.0366	0.0181	–	0.0070	0.0052	0.0063	0.0067
6	<i>C. nubiana</i>	0.0582	0.0339	0.0270	0.0393	0.0451	–	0.0047	0.0054	0.0065
7	<i>C. aegagrus</i>	0.0568	0.0171	0.0066	0.0268	0.0304	0.0256	–	0.0015	0.0022
8	<i>C. caucasica</i>	0.0662	0.0280	0.0195	0.0364	0.0387	0.0322	0.0077	–	0.0044
9	<i>C. hircus</i>	0.0669	0.0289	0.0271	0.0385	0.0421	0.0413	0.0115	0.0231	–

* Разделение по группам осуществлено в соответствии с априорной классификацией. Из расчетов исключены два образца *C. sibirica* (14, 20), последовательность *C. caucasica* AF034738 в соответствии с кластеризацией отнесена к *C. cylindricornis*, а образцы *C. cylindricornis* № 12 и 13 – к *C. caucasica*

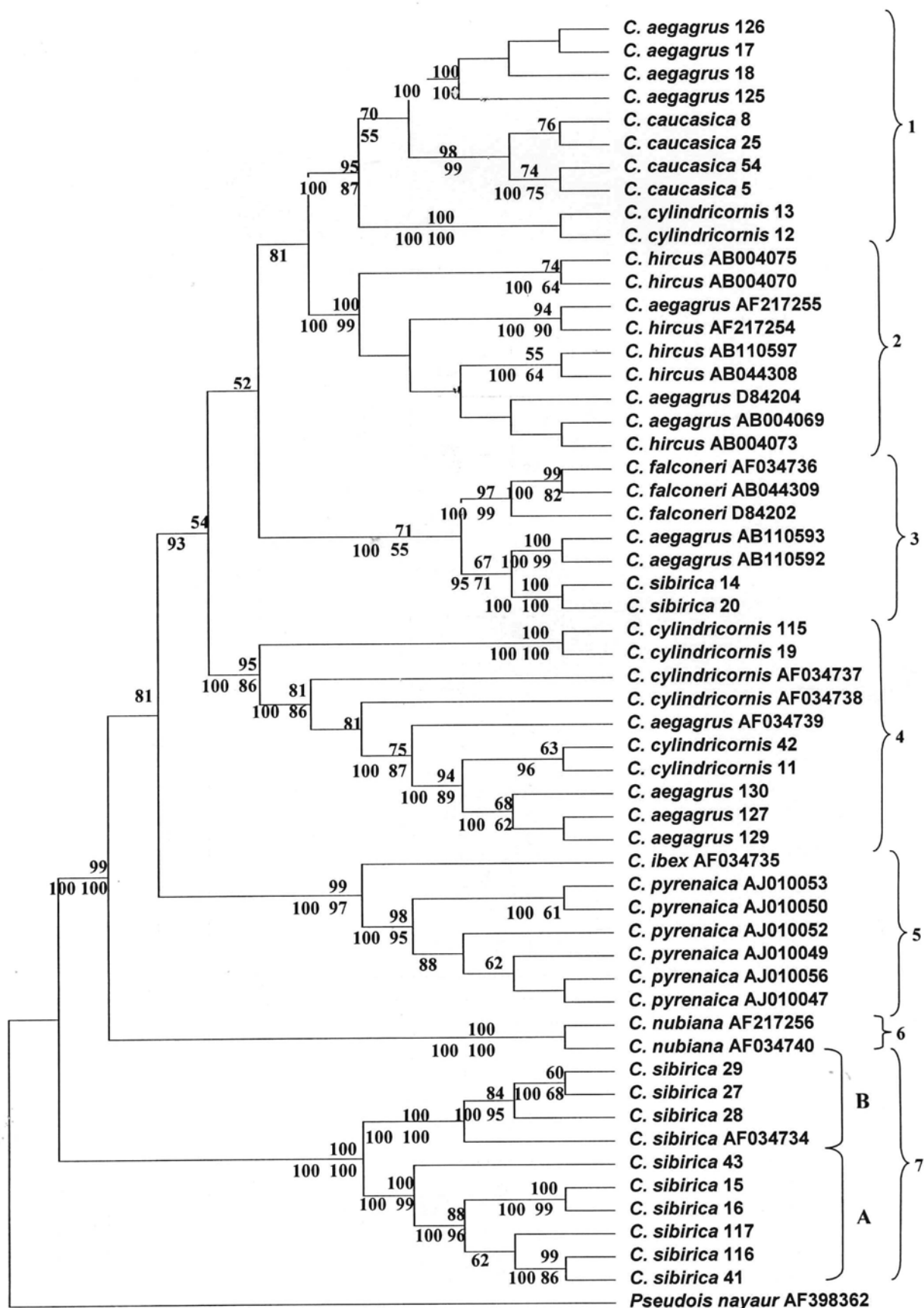


Рис. 8. Филогенетическое древо *Capra*, построенное на основании анализа последовательностей гена цитохрома b (1128 н.п.) методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) с использованием двухпараметрической модели Кимуры

Верхнее число в узлах – результат бутстреп-анализа. Правое нижнее число соответствует значению индекса бутстрепа для соответствующего узла в кладограмме, построенной методом максимальной парсимонии. Поддержка кластеров методом максимального правдоподобия – внизу слева. 1–7 – основные филогенетические ветви *Capra*

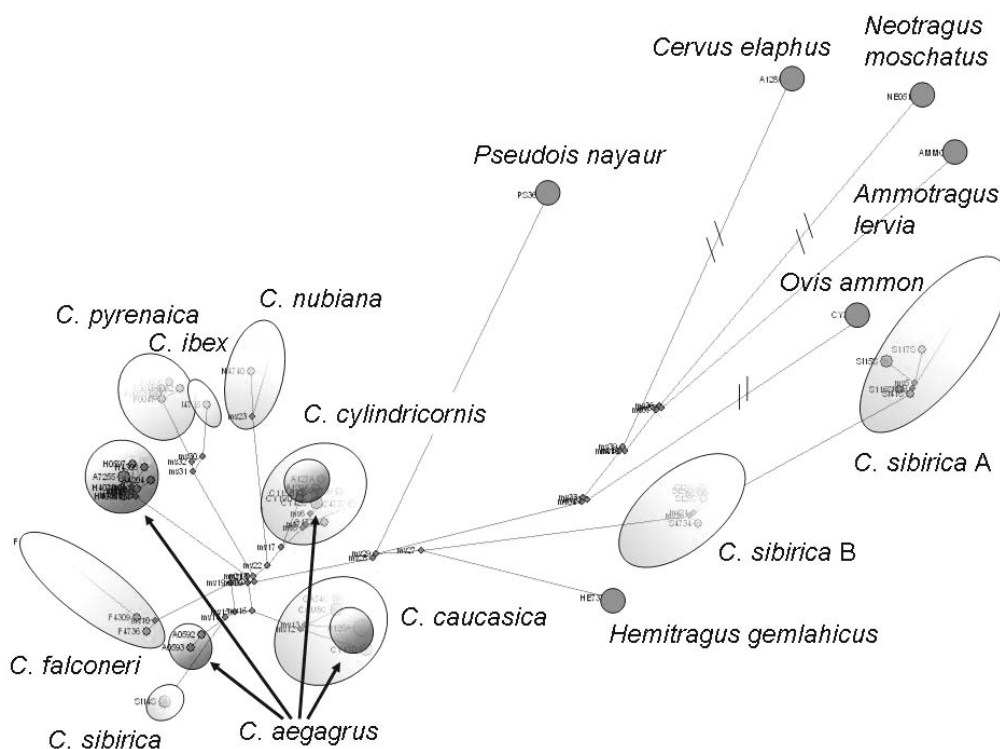


Рис. 9. Медианная сеть гаплотипов, построенная по последовательностям гена цитохрома b (1128 н.п.)

Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов

По результатам анализа изменчивости гена цитохрома *b*, род *Capra* не является строго монофилетической группой (рис. 8, 9) – наблюдается раннее отделение ветви *C. sibirica*. Дальнейший порядок дивергенции, опираясь на результаты анализа последовательностей гена цитохрома *b* мтДНК, установить сложно. Исключением является группа западноевропейских видов (*C. pyrenaica* и *C. ibex*), дивергенция которых, судя по сходству их митохондриальных геномов, произошла относительно недавно – гораздо позже появления остальных видов.

На кладограмме не удаётся выявить какой-либо отдельной ветви, которая объединяла бы представителей гипотетического вида «*C. ibex*», выделенного Эллерманом и Моррисон-Скоттом (Ellerman, Morrison-Scott, 1951) и Т. Хальтенортом (Haltenorth, 1963): западнокавказского, сибирского, нубийского и альпийского горных козлов. Нет также и отдельного кластера, объединяющего *C. caucasica* и *C. cylindricornis*. Группа кавказских козлов формирует две независимые ветви: все особи из Карачаево-Черкесии отличаются от экземпляров из Кабардино-Балкарии, Дагестана и Азербайджана. Последовательности двух животных из Северной Осетии гомологичны западнокавказским образцам. Полиморфизм мтДНК *C. aegagrus* и его нестабильное положение на кладограмме объясняется наличием 4-х митохондриальных линий (рис. 9). Выявлена большая генетическая дистанция между всеми линиями *C. aegagrus* и гомология последовательностей *C. aegagrus* с последовательностями других видов. Две гаплогруппы гомологичны двум группам кавказских горных козлов, третья объединяется с ветвью домашних коз и лишь одна гаплогруппа стоит особняком, обнаруживая отдалённое сходство с винторогим козлом.

Контрольный регион мтДНК

Изменчивость контрольного региона мтДНК, как и предполагалось, выше изменчивости гена цитохрома *b*. Из 402 позиций выравнивания 165 содержат замены (что составляет 41%), 94 из них информативны для анализа с помощью метода максимальной парсимонии. Среднее количество замен на одну последовательность – 37 транзиций и 6 трансверсий.

В последовательностях фрагмента контрольного региона образцов *C. cylindricornis* из Кабардино-Балкарии обнаружена уникальная делеция в 17 н.п., которая не встречается ни у *C. caucasica*, ни у других видов. Другая делеция (длиной в 1 н.п.), объединяет одну из линий *C. aegagrus* и *C. caucasica*.

Филогенетический анализ контрольного региона в целом подтверждает полученные ранее результаты: кавказские козлы формируют два отдельных кластера и обнаружена линия безоарового козла (с Кавказа), близкая к западнокавказскому козлу. Несколько иной порядок дивергенции, по сравнению с результатами анализа гена цитохрома *b*, можно объяснить очень высокой изменчивостью варибельного фрагмента контрольного региона и возрастанием уровня шума (увеличивается частота параллелизмов и обратных замен).

...

Итак, для большинства представителей *Capra* характерна высокая генетическая изменчивость изученных участков митохондриального генома. Видимо, различия между выделяемыми видами рода больше, чем представлялось ранее в соответствии с результатами только морфологических исследований. Используемые митохондриальные маркёры обладают высокой разрешающей способностью, однако они не позволяют достоверно определить последовательность дивергенции большинства видов.

Глава 6. Филогенетический анализ последовательностей Y-хромосомы

Последовательности двух разобщенных фрагментов интрона гена SRY (727 и 1105 н.п.) были объединены при анализе в одном выравнивании (1832 н.п.). Исследованные фрагменты ядерной ДНК оказались крайне консервативными. На 1832 позиции выравнивания отмечено всего 26 варибельных сайта (1,4%), 25 из них информативны для метода парсимонии. На одну последовательность в среднем приходится 5 транзиций и 3 трансверсии.

При филогенетическом анализе ядерной ДНК последовательность дивергенции видов *Capra* реконструируется иначе, нежели при анализе мтДНК (рис. 10, 11). При первом приближении выявляются две обособленные эволюционные линии: группа видов *C. falconeri* + *C. aegagrus* + *C. hircus* отлична от *C. sibirica*, *C. caucasica* и *C. cylindricornis*. *C. sibirica* не обнаруживает базального положения. Все образцы *C. sibirica*, включая «14» и «20», формируют единую монофилетическую группу, которая распадается на две ветви. Кавказские козлы образуют монофилетический кластер, который разделяется на две подгруппы: одну (*C. caucasica*) формируют образцы с Западного и Центрального Кавказа (из Карачаево-Черкесии и Кабардино-Балкарии), вторая (*C. cylindricornis*) представлена 4 образцами с Центрального и Восточного Кавказа (из Кабардино-Балкарии, Северной Осетии и Азербайджана).

Генетические дистанции находятся в строгом соответствии с порядком деления рода на эволюционные ветви (рис. 10, 11, табл. 4): наибольшие дистанции разделяют винторогого и сибирского, а также винторогого и кавказских козлов; сравнительно небольшое генетическое расстояние между группировками кавказских козлов.

При анализе данного участка генома порядок дивергенции видов определяется более чётко, нежели при анализе последовательностей митохондриальной ДНК. Большинство кластеров имеют хорошую поддержку, а невысокая поддержка некоторых кластеров (рис. 10) объясняется, прежде всего, малой изменчивостью анализируемого гена. С другой стороны, именно малая изменчивость фрагмента сводит к минимуму вероятность появления так называемых повторных замен и замен, возникающих независимо у генетически разобщенных групп.

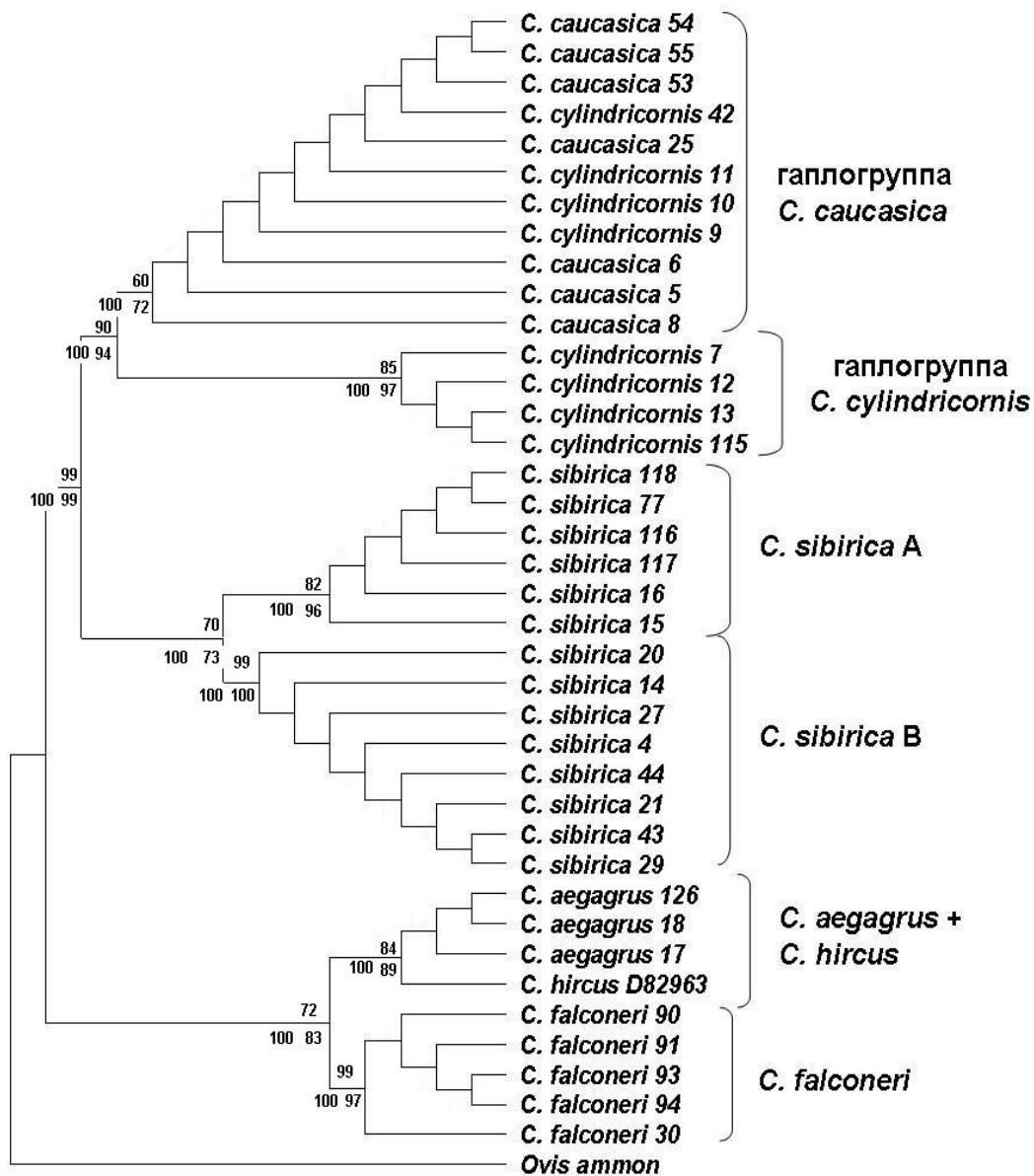


Рис. 10. Филогенетическое древо *Capra*, построенное по нуклеотидным последовательностям интрона гена SRY Y-хромосомы (1832 п. н.) методом ближайшего связывания (Neighbor-Joining) с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Верхнее число в узлах – результат бутстреп-анализа. Правое нижнее число соответствует значению индекса бутстрепа для соответствующего узла в кладограмме, построенной методом максимальной парсимонии. Поддержка кластеров методом максимального правдоподобия – внизу слева

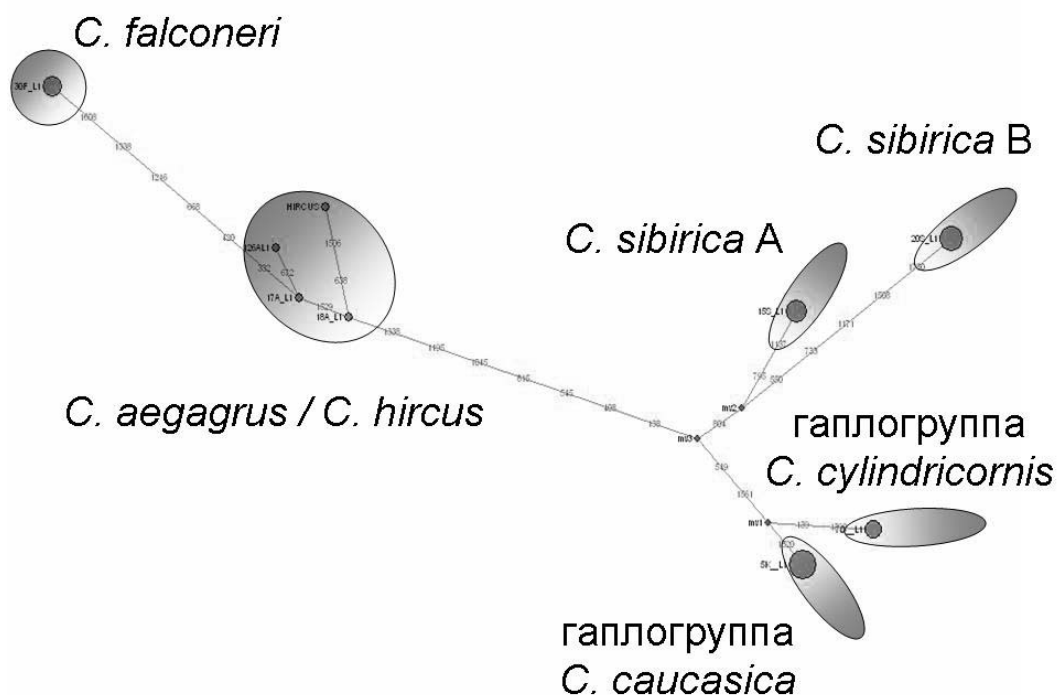


Рис. 11. Медианная сеть гаплотипов, построенная по последовательностям гена SRY (1832 н.п.) См. также пояснения к рис. 9

Таблица 4. Межгрупповые генетические дистанции (Net distance) для рода *Capra*, вычисленные по последовательностям гена SRY Y-хромосомы (1832 н.п.) с использованием двухпараметрической модели Кимуры*

S.E. net distance		1	2	3	4	5	6	7
1	<i>C. falconeri</i>	—	0.0015	0.0020	0.0023	0.0020	0.0022	0.0014
2	<i>C. aegagrus</i>	0.0033	—	0.0017	0.0019	0.0017	0.0019	0.0005
3	<i>C. sibirica</i> A	0.0077	0.0055	—	0.0014	0.0013	0.0014	0.0018
4	<i>C. sibirica</i> B	0.0088	0.0066	0.0033	—	0.0016	0.0017	0.0020
5	<i>C. caucasica</i>	0.0078	0.0056	0.0033	0.0040	—	0.0010	0.0018
6	<i>C. cylindricornis</i>	0.0083	0.0061	0.0039	0.0050	0.0019	—	0.0019
7	<i>C. hircus</i>	0.0039	0.0005	0.0061	0.0072	0.0062	0.0066	—

* Разделение на группы осуществлено в соответствии с полученной кластеризацией

Все исследованные митохондриальные и ядерные маркёры выявили родство *C. falconeri* и *C. aegagrus*. Видимо, эволюционное разделение этих видов произошло относительно недавно, и генетическая дистанция между ними невелика.

Все исследованные фрагменты генома обнаруживают монофилетичность для видов *C. nubiana* и *C. sibirica*, родство *C. hircus* и *C. aegagrus* и древность разделения двух групп *C. sibirica*.

Обнаружено, что морфологически сходные виды *C. sibirica*, *C. caucasica*, *C. ibex*, и *C. nubiana* (имеющие массивные, округлые в поперечном сечении, ребристые на передней поверхности и загнутые в одной плоскости рога), объединяемые некоторыми исследователями в сборный вид «*C. ibex*», имеют сходные гаплотипы Y-хромосомы. *C. pyrenaica* и *C. cylindricornis* являются, по всей видимости, производными формами исходного «*ibex*» типа. Виды *C. falconeri* и *C. aegagrus* представляют собой параллельную ветвь эволюции, характеризующуюся более грацильным телосложением и уплощенными рогами.

Глава 7. Реконструкция эволюционной истории рода *Capra*

Базальная филогения рода *Capra*

Анализ несоответствия в порядке дивергенции по митохондриальным и ядерным маркёрам и сопоставление этих данных с морфологической изменчивостью рода *Capra* позволил Н. Пидансер с соавторами (Pidancier et al., 2006) высказать гипотезу о древней гибридизации базальных групп рода. Авторы предполагают наличие двух центров эволюции («*C. sibirica*» в Монголии и «*C. aegagrus*» в Средней Азии), последующую экспансию «*C. sibirica*» на запад и гибридизацию с древним «*C. aegagrus*». Результатом стала интрогрессия мтДНК «*C. aegagrus*» и формирование «гибридных» видов *C. caucasica*, *C. cylindricornis*, *C. nubiana*, *C. ibex* и *C. pyrenaica*.

Последовательность филогенетических событий, с учётом гипотезы Н. Пидансер (Pidancier et al., 2006) и наших результатов, схематично показана на рисунке 12. Раннее разделение рода на две ветви нашло отражение в кластеризации Y-хромосомных гаплотипов (рис. 10) и в дистанцированности митохондриальных гаплотипов *C. sibirica* (рис. 8, 9). Интрогрессия мтДНК «*C. aegagrus*» и одновременное распространение Y-хромосомы «*C. sibirica*» среди *C. caucasica*, *C. cylindricornis*, *C. nubiana*, *C. ibex*, и *C. pyrenaica* стало причиной объединения большинства видов с *C. aegagrus* по мтДНК (рис. 8) и с *C. sibirica* по Y-хромосоме (рис. 10).

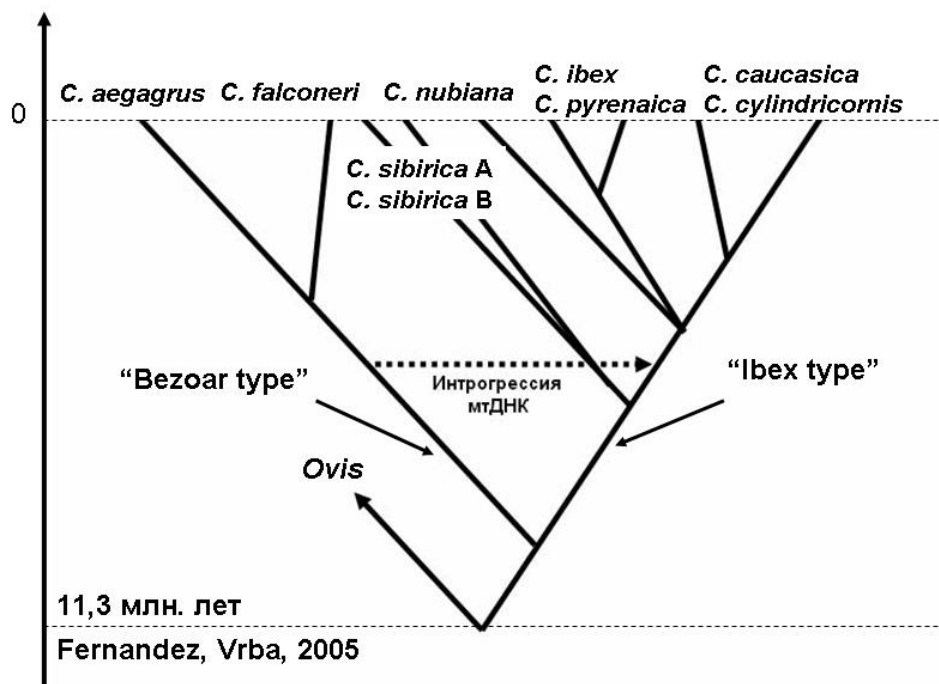


Рис. 12.
Филогенетическая схема
рода *Capra*

Схема эволюции (рис. 12) в общих чертах даёт возможное объяснение и имеющемуся пространственному распределению морфологических форм, близких к *C. sibirica*: *C. ibex* – в Европе, *C. nubiana* – на Аравийском полуострове и *C. caucasica* – на Кавказе. Согласно этой гипотезе, они являются потомками древнего «*C. sibirica*», унаследовавшими от параллельной ветви (*C. aegagrus* + *C. falconeri*) только мтДНК.

Филогения *C. falconeri*

Анализ изменчивости краниальных признаков подтверждает видовую самостоятельность винторогого козла и показывает его дистанцированность от других представителей *Capra*. В то же время, являясь морфологически наиболее ярким видом, винторогий козёл оказывается генетически слабо обособленной группой. Он сохраняет небольшую генетическую дистанцию с другими видами как при анализе митохондриального гена, так и фрагмента Y-хромосомы.

В свете полученных результатов *C. falconeri* не может быть однозначно причислен к видам, имеющим древние корни, как можно было бы предположить, исходя исключительно из морфологических данных.

Филогения *C. sibirica*

Ранее, большей частью по географическому принципу, было описано 13 рас (подвидов) *C. sibirica*. К.К. Флеров (1935), одним из первых усомнившийся в реальности многообразия форм сибирского козла, оставил только две из них: *C. sibirica sibirica* (Южная Сибирь и Монголия) и *C. s. sakeen* (остальная часть ареала). Эта точка зрения не стала превалирующей, видимо, по причине отсутствия доказательной базы. Позже В. И. Цалкин (1950), проведя ревизию, определил иной состав вида, который был поддержан И. И. Соколовым (1959): *C. sibirica sibirica* (Алтай, Саяны, Северная Монголия), *C. sibirica hagenbeckii* (Гобийский Алтай, возвышенности Заалтайской Гоби), *C. sibirica alaiana* (Восточный и Центральный Тянь-Шань, Памир), *C. sibirica formosovi* (Западный Тянь-Шань), *C. sibirica dementievi* (Западный Куньлунь, на восток до Кэрийского хребта). В дальнейшем В. Г. Гептнер (Гептнер и др., 1961) принял, правда с некоторыми оговорками, точку зрения К. К. Флерова, выделив алтайского *C. s. sibirica* и среднеазиатского *C. s. alaiana* козлов.

Наши данные показывают высокий уровень морфологической и генетической дифференциации и географическую приуроченность двух форм *C. sibirica*, подтверждая

правомерность построений К.К. Флерова (1935). Существование некоторого количества «неверно определённых» морфологических экземпляров и образца 43 из Иркутской области, имеющего Y-хромосому «В» типа (рис. 10), позволяет говорить о гибридизации между этими формами.

На фоне двуполярной генетической и морфологической структуры *C. sibirica* выделяются два образца (14 и 20, рис. 8, 9). Они имеют типичную для *C. sibirica* последовательность гена SRY Y-хромосомы и, очевидно, заимствованную у другого вида мтДНК. Наблюдаемое несоответствие может быть следствием недавней гибридизации и начала интрогрессии мтДНК. Учитывая современное распространение видов и сходство последовательностей гена цитохрома *b* (рис. 9) можно предположить, что «донором» мтДНК был или *C. falconeri*, или *C. aegagrus*, или *C. hircus*.

Филогения *C. ibex* и *C. pyrenaica*

Эти европейские виды хорошо различаются морфологически. Пиренейский козёл *C. pyrenaica* имеет гетеронимный изгиб рогов, что сближает его с восточнокавказским и винторогим козлами. Альпийский козёл *C. ibex* морфологически близок к другим «козерогам»: *C. caucasica*, *C. nubiana* и, особенно, к *C. sibirica*. Однако, учитывая сходство *C. ibex* и *C. pyrenaica* на генетическом уровне, можно заключить, что как отдельные эволюционирующие единицы они сформировались гораздо позже других видов.

Филогения *C. aegagrus*

Безоаровый козёл имеет характерную внешность, однако по краниальным признакам он довольно близок к другим видам (рис. 2). Последовательности исследованного гена Y-хромосомы *C. aegagrus* единообразны, видоспецифичны, и наибольшее сходство имеют с последовательностями *C. hircus* и *C. falconeri* (рис. 11). Митохондриальный геном, напротив, представлен несколькими отличными филогенетическими линиями, некоторые из них обнаруживают гомологию с мтДНК других видов (рис. 9). Объяснить такой полиморфизм митохондриального генома можно по-разному. Во-первых, изменчивость мтДНК может быть наследием анцестрального полиморфизма, и, таким образом, *C. aegagrus* оказывается политипическим видом изначально (до появления «гибридных» видов). Альтернативной гипотезой может быть «возвращение» гаплотипов мтДНК представителям *C. aegagrus* от уже сформированных видов *C. caucasica*, *C. cylindricornis* и *C. hircus*. В этом случае наличие многих эволюционных линий внутри вида *C. aegagrus* – явление вторичное. Сходство митохондриальных линий *C. aegagrus* с последовательностями только тех видов, с которыми он в историческое время имел перекрывающиеся или близкорасположенные ареалы (с *C. caucasica*, *C. cylindricornis* и *C. hircus*), подтверждает вторую гипотезу.

Современный ареал *C. aegagrus* на Кавказе мелкоочаговый и ограничивается территорией Дагестана, Чечено-Ингушетии, Азербайджана, Армении и Грузии. Однако, ранее безоаровый козёл был повсеместно распространён на Главном Кавказском хребте от Военно-Грузинской дороги (возможно, от бассейна Кубани) до восточных склонов, примыкающих к Каспийскому морю, а также в центральной и восточной части Малого Кавказа (Верещагин, 1949, 1959; Гептнер и др., 1961; Барышников, 1978). Ископаемых остатков *C. aegagrus* плейстоценового возраста на Большом Кавказе не обнаружено, что свидетельствует о его недавнем появлении на этой территории. Заселение Главного Кавказского хребта, происходило, видимо, из Передней Азии через Центральный Кавказ, что подтверждает большое сходство последовательностей гена цитохрома *b* *C. aegagrus* с последовательностями *C. caucasica* и *C. cylindricornis* из Карачаево-Черкесии и Кабардино-Балкарии соответственно. Меньшая генетическая дистанция по гену цитохрома *b*, отделяющая *C. aegagrus* от *C. cylindricornis*, говорит о более поздней гибридизации с этим видом по сравнению с *C. caucasica*.

Филогения *C. caucasica* и *C. cylindricornis*

Традиционно признается, что формирование видов *C. caucasica* и *C. cylindricornis* происходило на Кавказе. Однако было не ясно, почему восточнокавказский козёл быстро специализировался и приобрёл яркое морфологическое своеобразие, тогда как западнокавказский сохранил «примитивный» облик и сходство с *C. sibirica*, *C. nubiana* и *C. ibex*. Неясными оставались также причины и механизмы, обеспечившие изоляцию двух форм козлов на относительно небольшой территории Кавказа.

Судя по палеонтологическим сведениям, крупные плейстоценовые «козероги» (*Ibex sebennarum*, *I. priscus*, *I. senomanus*, *Capra prisca*) были широко распространены в Европе, включая Крым и Кавказ (Громова, 1935, 1948; Громов, 1948; Верещагин, 1959). Большое сходство видового состава крупных животных Крыма и Кавказа позволяло считать (Верещагин, 1959), что эти территории «получили плиоценовых и плейстоценовых зверей из одного источника и даже соединялись друг с другом в нижнем плейстоцене через какую-то сушу на месте Азовского моря». Ближайшие к Крыму (около 350 км на северо-запад) ископаемые находки «козерогов» относятся к палеолитическим стоянкам человека близ Одессы и к верхне-ориньякским стоянкам на побережьях рек Днестр и Прут (около 600 км). Учитывая, что часть плейстоценовых «козерогов» Западной Европы морфологически ближе к *C. caucasica*, чем к *C. ibex* или *C. pyrenaica* (Rivals, 2006), можно полагать, что в плейстоцене именно древний «*C. caucasica*» населял горы Западной Европы и Крыма.

Возникает предположение, что исконно кавказским видом является лишь *C. cylindricornis*, в то время как *C. caucasica* – относительно недавний вселенец, филогенетически близкий *C. ibex*. Однако, полученные нами данные не подтверждают наличие тесных родственных связей *C. caucasica* ни с современными западноевропейскими видами (*C. ibex* или *C. pyrenaica*), ни с *C. sibirica* и *C. nubiana*.

Учитывая широкое распространение «*C. caucasica*» в плейстоцене и родство современных *C. caucasica* и *C. cylindricornis*, эволюцию группы можно представить следующим образом: появление общего предка *C. caucasica* и *C. cylindricornis* на Кавказе, его расселение в Западную Европу, последующее возвращение *C. caucasica* на Кавказ и гибридизацию с *C. cylindricornis*. Факт существования гибридной популяции козлов на территории Кабардино-Балкарии не подвергается сомнению (Гептнер и др., 1961; Соколов, Темботов, 1993; Данилкин, 2005; и др.). Результатом гибридизации, очевидно, является частичное перемешивание ядерных и митохондриальных линий этих форм на Центральном Кавказе: большинство особей из Кабардино-Балкарии имеют мтДНК *C. cylindricornis* и Y-хромосому *C. caucasica*. Вторичная гибридизация, вероятно, стала и причиной клинальной изменчивости морфологических признаков этих животных на Центральном Кавказе.

К таксономии рода *Capra*

Единого направления изменчивости внешних морфологических признаков и дискретных отличий между выделяемыми видами *Capra* по большинству из них нет. Тем не менее нельзя отрицать, что все представители рода имеют весьма характерную внешность (*C. falconeri*, *C. aegagrus* и группа кавказских козлов в особенности). Кроме того, у *Capra* довольно высоки межвидовые дистанции (Net distance) по гену цитохрома b (табл. 3), которые сопоставимы с таковыми у других копытных: 1,8–10,4 – для видов рода *Procapra*; 2–5,33 – *Ovis*; 1,76–9,03 – *Gazella*; 3,4–6,4 – *Moschus*; 0,41–0,62 – различия между *Cervus elaphus* и *C. nippon*; 4,12 – *Capreolus capreolus* и *C. pygargus* (Arctander et al., 1996; Randi et al., 1996, 1998; Boyce et al., 1999; Nagata et al., 1999; Vernesi et al., 2002; Lei et al., 2003; Ludt et al., 2004; Сорокин, 2005; Zhang, 2005; Kholodova et al., 2006; Кузнецова, 2007; Chao-Ting Xiao, 2007; и др.). Внутривидовая изменчивость гена SR Y у *Capra* близка нулю, у других копытных она также не превышает 1,06±0,27 замен на 1000

н.п. (Meadows et al., 2004). Межвидовые различия у *Capra* по этому гену гораздо выше (рис. 11, табл. 4). В данном контексте придание видового статуса исследованным внутривидовым группировкам (*C. falconeri*, *C. aegagrus*, *C. sibirica* A, *C. sibirica* B, *C. nubiana*, *C. caucasica* и *C. cylindricornis*) представляется вполне корректным. В то же время, разделение *Capra* на несколько отдельных подродов или родов, в свете полученных результатов (генетических свидетельств межвидовой гибридизации, в частности), выглядит необоснованным.

Ни по одному из молекулярно-генетических маркёров не обнаружено доказательств как древнего происхождения винторогого козла, так и близкого родства видов, имеющих гетеронимный изгиб рогов: *C. falconeri*, *C. pirenaica*, *C. cylindricornis*. Вероятно, возникновение этого признака, совершенно преобразующего облик животных, происходит благодаря ограниченному числу мутаций, и взятый в отдельности, он, видимо, не может служить как надёжным критерием для оценки родства видов, так и основанием для повышения таксономического ранга группы.

Высокий уровень морфологической и генетической дифференциации двух современных форм *C. sibirica sibirica* и *C. s. sakeen* (Флеров, 1935), ничуть не меньший уровня дифференциации большинства других видов, в рамках существующих систем рода (Соколов, 1979; Павлинов, 2003) может служить достаточным основанием для присвоения им статуса морфологических видов.

Заключение

Несмотря на то, что диагностическая значимость краниальных признаков в таксономии признаётся абсолютным большинством зоологов, сделать выводы о филогенетических связях внутри рода *Capra*, опираясь исключительно на краниометрические данные, весьма затруднительно. При сравнении результатов морфологического и молекулярно-генетического исследования обнаружено несоответствие между относительными межвидовыми дистанциями. Связано это, вероятно, с тем, что морфологические структуры функционально нагружены, находятся под давлением отбора, и, кроме того, представляют собой результат онтогенеза, а следовательно, своеобразную «систему корреляций» (Шмальгаузен, 1982). Эти особенности существенно затрудняют оценку вклада филогенетической составляющей на этапе формирования каждого из признаков. С другой стороны, многомерный анализ метрических признаков черепа *Capra* позволяет дифференцировать внутривидовые группировки, очевидно, являющиеся отдельными эволюционирующими единицами, что служит важным подспорьем для дополнительной проверки филогенетических гипотез.

Большинство изменений, зафиксированных в геноме, являются нейтральными и потому обладают большей филогенетической информативностью. Противоречия между реконструкциями, полученными на основании анализа последовательностей митохондриальных и ядерных маркёров *Capra*, свидетельствуют о нелинейном распространении эволюционных преобразований в процессе становления видов. Гибридизация и интрогрессия мтДНК, став причиной неоднократного перемешивания митохондриальных и ядерных линий *Capra*, сыграли значимую роль в становлении генетического разнообразия рода. Полученные результаты позволяют заключить, что подобная «перетасовка» генетического материала не редкость, особенно если речь идет об эволюционно молодых таксонах, когда между ними ещё не возникло жесткого (как правило, генетически или физиологически обусловленного) репродуктивного барьера.

Выводы:

1. Краниальные признаки *Capra* формируются к 4-м годам и отличаются высоким уровнем половой изменчивости. Межвидовая изменчивость краниальных признаков имеет «мозаичный» характер – морфологическая дифференциация отражена в разных структурах черепа в зависимости от сравнения той или иной пары видов.
2. Изменчивость гена цитохрома b и контрольного региона мтДНК *Capra* довольно высока (вариабельными являются 20,1 и 41% сайтов соответственно). Изменчивость ядерного гена SRY, напротив, крайне низка (1,4% позиций), но все же позволяет установить порядок дивергенции включённых в исследование видов.
3. Сопоставление результатов анализа морфологических признаков, митохондриальных и ядерных последовательностей нуклеотидов позволяет сделать вывод о недостаточности каждого из критериев в отдельности для реконструкции филогенеза *Capra* и таксономических построений и о необходимости комплексного подхода.
4. В становлении генетического разнообразия *Capra* значимую роль играла гибридизация базальных групп рода. Относительно недавние эволюционные события – гибридизация кавказских козлов, формирование нескольких митохондриальных линий *C. aegagrus* вследствие интрогрессии мтДНК, появление чужеродных гаплотипов мтДНК в популяциях *C. sibirica*.
5. Винторогий козел *C. falconeri* наиболее дистанцирован от других форм по краниальным признакам. Однако генетически он слабо обособлен, и поэтому не может быть признан древним видом рода. По многим морфологическим и молекулярно-генетическим признакам он близок к *C. aegagrus*.
6. Группа кавказских козлов отличается от других видов *Capra* по краниальным признакам, но чёткой внутренней дифференциации и ясной географической границы между западной и восточной формами нет. Существующая клинальная морфологическая изменчивость кавказских козлов объясняется вторичной гибридизацией исходно различных форм. Генетические дистанции между митохондриальными и ядерными линиями *C. caucasica* и *C. cylindricornis* весьма существенны.
7. Высокий уровень морфологической и генетической дифференциации двух современных форм *C. sibirica* (не меньший, чем уровни дифференциации большинства других видов) и их чёткая географическая приуроченность могут служить достаточным основанием для присвоения им статуса морфологических видов.
8. Сходство митохондриальных геномов западноевропейских видов *Capra* свидетельствует об одной миграционной волне предков *C. ibex* и *C. pyrenaica* в Европу и их относительно недавней дивергенции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из перечня ВАК и других изданиях:

- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** Кузнецова М.В., Данилкин А.А., 2007. Реконструкция филогении рода *Capra* (Bovidae, Artiodactyla) на основании анализа митохондриальной ДНК // Генетика. Т. 43, № 2. С. 245–253.
- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** 2004. Межвидовые дистанции внутри рода *Capra* на основании краниометрических данных // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Матер. конф. сотруд. ИПЭЭ РАН. 20–21 апреля. М.: КМК. С.65–68.
- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** Кузнецова М. В., Данилкин А.А., 2005. Таксономические отношения представителей рода *Capra* по данным последовательности контрольного региона мтДНК // Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России. Матер. науч.-практ. конф. М. С. 188–191.
- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** Кузнецова М. В., Данилкин А.А., Подтяжкин О.И., 2005. Анализ последовательностей фрагмента контрольного региона мтДНК представителей рода *Capra* // Копытные в зоопарках и питомниках. М: Моск. зоопарк. С. 80–84.
- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** 2006. Роль гибридизации в эволюционной истории рода *Capra* (Artiodactyla, Bovidae) // Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Матер. конф. сотруд. ИПЭЭ РАН. 5–6 октября. М.: КМК. С. 116–123.
- Звычайная Е.Ю.,** 2007. Реконструкция филогении рода *Capra* (Bovidae, Artiodactyla) по результатам анализа митохондриальных и ядерных генов // Молекулярно-генетические основы сохранения разнообразия млекопитающих Голарктики. Матер. междунар. конф. 26–30 ноября. Черноголовка. М.: КМК. С. 86–95.
- Звычайная Е.Ю.,** Кузнецова М.В., Данилкин А.А., 2007. Генетическая дифференциация кавказских горных козлов (*Capra caucasica* и *C. cylindricornis*) // Млекопитающие горных территорий. Матер. междунар. конф. 15–18 августа. Нальчик. М.: КМК. С. 124–127.

Тезисы конференций:

- Kuznetsova M.V., **Kazanskaya E.J. (Zvychnaya E.Y),** Danilkin A.A., 2004. Analysis of *Capra* samples from Caucasus region based on mitochondrial D-loop sequences // The FEBS Forum for Young Scientists. 12–15 july. V. 271, S. 1. P. 32.
- Казанская Е.Ю. (Звычайная Е.Ю.),** 2007. Происхождение западнокавказского горного козла (*Capra caucasica*, Bovidae, Artiodactyla) // Териофауна России и сопредельных территорий. (VIII съезд Териолог. о-ва). М.: КМК. С. 179.
- Zvychnaya E.Y.,** 2007. Genetic differentiation of *Capra aegagrus* (Bovidae, Artiodactyla) // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. Mater. III Intern. Young Scientists conf. 15–18 May, Odessa. P. 236.
- Zvychnaya E.Y.,** 2007. Role of the ancient and recent interspecific hybridization in forming of the genus *Capra* (Bovidae, Artiodactyla) // 13th Annual European Meeting of PhD Students in Evolutionary Biology. 14–17 of August. Sweden. P. 26.