

на правах рукописи

ГРИГОРЬЕВА Ольга Олеговна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВНУТРИВИДОВЫХ
ФОРМ ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ
SOREXARANEUS (MAMMALIA)**

Специальность 03.02.04 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Лаборатории микроэволюции млекопитающих
Учреждения Российской академии наук
Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Научный руководитель: д.б.н., зав. лаб. микроэволюции млекопитающих
Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН
В.Н. Орлов

Официальные оппоненты: д.б.н., вед.науч. сотр. Института биологии
развития им. Н.К. Кольцова РАН
И.Ю. Баклушинская

к.б.н., науч. сотр. Института общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН
Н.В. Гордеева

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Московский государственный
университет им. М.В. Ломоносова» (Биологический
факультет)

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2012 г. в _____
на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д.002.213.01
при Учреждении Российской академии наук Института проблем экологии и
эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект,
д. 33.

Телефон/факс: (495) 952-35-84, www.sevin.ru, e-mail: admin@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических
наук Учреждении Российской академии наук Института проблем экологии и
эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект,
д. 33.

Автореферат разослан « ____ » _____ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е.А. Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последнее время появляется все больше работ, посвященных филогеографии различных видов животных. Это связано с широким применением молекулярных методов, основанных на анализе как митохондриальной, так и ядерной ДНК. Они являются мощным инструментом для выявления границ между таксонами, в том числе и морфологически неразличимыми сестринскими криптическими видами. Использование молекулярных методов позволяет выявить монофилетические кластеры, исследовать их филогенетические связи и оценить степень и время дивергенции последовательностей ДНК внутри кластеров.

Обыкновенная бурозубка *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) – мелкая землеройка с обширным ареалом, обладает уникальным кариотипическим разнообразием и может служить удобным объектом для изучения эволюционных факторов отбора и изоляции, ведущих к образованию внутривидовых таксонов.

К настоящему времени у *S. araneus* описано более 70 хромосомных рас – больших географических популяций, которые отличаются диагностическими признаками хромосомного набора и четыре криптических сестринских вида (Wójcik *et al.*, 2003; Орлов и др., 2004; Щипанов и др., 2009; White *et al.*, 2010).

Обыкновенная бурозубка служит удобной моделью для изучения зон контакта и гибридизации как хромосомных рас (внутривидовых форм), так и близких аллопатрических видов. На фоне хорошей кариологической изученности популяций обыкновенной бурозубки особенно заметна слабая изученность молекулярной изменчивости популяций, особенно восточноевропейского и сибирского участков ареала вида, работы по которым единичны (Банникова и др., 2006; Balakirev *et al.*, 2007; Банникова, Лебедев, 2010; Распопова, Щипанов, 2011; Horn *et al.*, 2011).

Использование современных молекулярно-генетических методов для исследования филогеографической структуры обыкновенной бурозубки позволит сопоставить изменчивость хромосомных наборов и последовательностей ДНК, оценить величину потока генов в зонах контакта хромосомных рас и

аллопатрических видов и изолирующую роль хромосомных перестроек, эволюционные последствия гибридизации.

Помимо теоретического значения исследования, знание распределения и структуры популяций *S. araneus* необходимо для совершенствования классификации и сохранения биологического разнообразия вида.

Цель и задачи исследования: изучить молекулярно-генетические особенности внутривидовых форм обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. в сравнении с близкими сестринскими видами. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать изменчивость гаплотипов гена цитохрома *b*и аллелей микросателлитных локусов в некоторых восточноевропейских популяциях обыкновенной бурозубки и в популяции кавказской бурозубки;
2. Сопоставить цитогенетическую и молекулярную изменчивость в надвиде *S. araneus*;
3. Оценить влияние процессов изоляции расстоянием, древней и современной островной изоляции на изменчивость гаплотипов гена цитохрома *b*и аллелей микросателлитных локусов в популяциях обыкновенной и кавказской бурозубок;
4. Оценить влияние гибридогенных процессов на молекулярную изменчивость трех хромосомных рас обыкновенной бурозубки – Москва, Селигер и Западная Двина – в зоне контакта их ареалов на Валдайской возвышенности;
5. Оценить возможности использования молекулярных и цитогенетических данных в таксономии надвида *S. araneus*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые проанализирована изменчивость микросателлитных локусов в восточноевропейских популяциях *S. araneus* и в популяции близкого, географически замещающего вида кавказской бурозубки, *S. satunini*. Сопоставлена кариологическая изменчивость с изменчивостью по митохондриальным и микросателлитным маркерам различных хромосомных рас обыкновенной бурозубки, а также *Sorex satunini*. Обнаружена значительная подразделенность популяций. Не выявлено локусов

микросателлитной ДНК, способных диагностировать хромосомные расы, и сделан вывод, что хромосомные перестройки у этого вида не ограничивают поток генов через гибридные зоны. На основании последовательностей гена цитохрома *b* выделено несколько филогрупп в пределах *S. araneus*, указывающих на плейстоценовый возраст хромосомных рас этого вида.

Практическая значимость работы связана с разработкой методики анализа микросателлитной ДНК *S. araneus* и *S. satunini*, что может пригодиться для оценки генетического разнообразия и структуры популяций *S. araneus* и близких видов.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на 8 международных и всероссийских конференциях и совещаниях, в том числе: «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва, 2010), «Целостность вида у млекопитающих: изолирующие барьеры и гибридизация» (Петергоф, 2010), «Advances in the biology of shrews III» (Сыктывкар, 2010), «Современные биологические аспекты в фундаментальных исследованиях молодых учёных» (Томск, 2010), «Териофауна России и сопредельных территорий» (Москва, 2011), «Экология: сквозь время и расстояние» (Екатеринбург, 2011), «Состояние и проблемы экосистем среднерусской лесостепи» (Воронеж, 2011), «VI European Congress of Mammalogy» (Париж, 2011) и на объединенном коллоквиуме лаборатории микроэволюции млекопитающих, кабинета методов молекулярной диагностики и лаборатории популяционной экологии, состоявшемся 28.10.11.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ (6 статей и 10 тезисов докладов и материалов конференций), из них 4 статьи в журналах списка ВАК.

Структура и объем работы. Текст диссертации изложен на 140 страницах и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и пяти приложений. Работа включает 18 таблиц и проиллюстрирована 19 рисунками.

Благодарности. Автор выражает благодарность В.Н. Орлову за руководство работой на всех этапах ее осуществления; С.Г. Потапову за помощь в освоении молекулярно-генетических методик, интерпретации результатов. Автор признателен

М.Л. Опарину, А.Г. Шестак, В.Б. Сычевой, В.В. Стахееву за содействие в сборе полевого материала; А.И. Козловскому, Ю.М. Борисову и Е.В. Черепановой – за помощь в проведении кариологического исследования материала. Искреннюю благодарность автор выражает коллективу лаборатории микроэволюции млекопитающих за постоянную поддержку и ценные советы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность работы, ее теоретическая и практическая значимость, поставлены цели и задачи исследования.

Глава 1. Молекулярно-генетические подходы к проблемам видовой диагностики и внутривидовой структуры (обзор литературы)

В разделе рассматриваются проблемы диагностики близких видов и внутривидовых форм с использованием данных по митохондриальному геному, таксономия надвида *S. araneus* и возможности использования микросателлитной ДНК в оценке внутривидовой изменчивости.

Глава 2. Материал и методы

Работа выполнялась в 2009-2011 гг. на базе ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Отлов землероек проводился в различных регионах европейской части России, прежде всего, на Валдайской возвышенности, а также в Вологодской, Ивановской, Новгородской, Московской, Псковской, Саратовской и Ростовской областях (рис. 1). Для анализа аллелей 19 микросателлитных локусов использованы образцы печени 180 экз. *S. araneusi* 14 экз. *S. s. tembotovi*, для анализа гаплотипов гена цитохрома *b* (*cytb*) – 61 экз. *S. araneusi* 7 экз. *S. s. tembotovi* из той же выборки. Из Генбанка взяты 70 последовательностей гена *cytb*. Образцы получены от особей с известным кариотипом. Анализ хромосомных препаратов проведен в.н.с. Ю.М. Борисовым, с.н.с. А.И. Козловским и н.с. Е.В. Черепановой.

Амплификацию проводили по стандартной методике. Продукты амплификации микросателлитной ДНК разделяли путем электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле в 1 x TBE-буфере при 300 Вв течение 2 ч, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. В качестве маркеров длины фрагментов использовали стандарты молекулярной массы в 100 п.н. Очищенную мтДНК секвенировали в обоих направлениях на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant. Полученные последовательности мтДНК депонированы в Генбанке под номерами JN984059–JN984127. Длина анализируемых последовательностей составила 953 п.н.

Оценку генетического разнообразия и структуры на основании данных микросателлитной ДНК проводили с использованием программ HP-RARE, FSTAT v.2.9.3, GENEPOP v.4, MICRO-CHECKER, FREENA. Анализ генетического структурирования был проведен на трех уровнях. Во-первых, особи *S. araneus* были сгруппированы согласно принадлежности к хромосомной расе и составили шесть выборок. Во-вторых, особи из 19 различных пунктов сбора (локалитетов) рассматривались как независимые выборки. И наконец, каждая раса была рассмотрена отдельно, при этом особи внутри расы группировались по локалитетам. Образцы *S. s. tembotovi* и хромосомных рас Санкт-Петербург, Кириллов и Сок взяты только из одного локалитета, поэтому их структурный анализ не представлялся возможным. Кластеризацию хромосомных рас выполняли с использованием программного обеспечения GENETIX v.4.03. Влияние на генетические дистанции удаленности взятых выборок от зоны контакта рас оценивалось тестом Мантела с использованием программы GENALEX v.6. Анализ данных на выявление стадии «бутылочного горлышка» (недавнее сокращение эффективного размера популяции) проводился с использованием программного обеспечения BOTTLENECK v.1.2.02.

Первичную обработку мтДНК, расчет значений гаплотипического и нуклеотидного разнообразия проводили с использованием программного обеспечения CHROMAS v.2.01, SEQMAN v.4.05, EDITSEQ v.4.05, BIOEDIT v.7.0.9.0, DNASP v.5, MEGA v.5, ARLEQUIN v.2.0. Медианная сеть гаплотипов цитохрома *b* была построена с использованием программы NETWORK v.4.6.0.0.

Глава 3. Изменчивость микросателлитных локусов в популяциях

S. araneus и *S. s. tembotovi*

3.1. Генетическое разнообразие

Генетическое разнообразие *S. araneus*. Для всех локусов характерен низкий уровень полиморфизма. Общее количество аллелей на локус во всех расах колебалось от 2 (L62) до 5 (L9, D103, D107). Мы не обнаружили значительных различий между расами по числу аллелей на локус, откорректированному по минимальному размеру выборки. Меньшее количество аллелей на локус наблюдалось у рас Кириллов ($N = 19$) и Сок ($N = 18$), но каждая из этих рас была представлена одной выборкой, размер их был меньше размеров выборок гибридной зоны. Таким образом, низкий уровень генетических различий рас говорит о слабом влиянии хромосомных различий на генетическую структуру популяций.

Для большинства локусов характерно наличие одного аллеля с высокой частотой встречаемости и нескольких – с низкой (табл. 1), поэтому возможно искажение частот аллелей в малых выборках. Тем не менее, расы отличаются по частоте встречаемости некоторых аллелей, особенно аллелей наиболее полиморфных локусов, L9, D103, D107.

Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) варьировала от 0,2 до 0,46 со средним 0,32, ожидаемая (H_e) – от 0,09 до 0,71 со средним 0,49. По большинству локусов наблюдаемая гетерозиготность оказалась ниже ожидаемой. Исключение составили локусы V30, L16, L67, в которых значения наблюдаемой гетерозиготности превышают значения ожидаемой во всех исследованных выборках.

Проверка данных на неравновесие по сцеплению свидетельствует о том, что локусы не сцеплены между собой. Результаты анализа хромосомных рас и всех взятых выборок выявили значительные отклонения от равновесия по локусам A8, L2, L69. Для них значения индекса инбридинга (F_{is}), свидетельствующие о дефиците гетерозигот, при сравнении рас составили 0,489, 0,576 и 0,579, соответственно, и 0,425, 0,561, 0,574 – при сравнении выборок. Суммарные для всех локусов индексы инбридинга для выборок и для рас в целом близки по значению и попадают в 95% доверительный интервал. Наибольший дефицит гетерозигот отмечался у

хромосомных рас Западная Двина, Москва и Санкт-Петербург, наименьший – у расы Сок (табл. 2). Дефицит гетерозиготности может быть результатом присутствия нулевого аллеля или подразделенности выборок. Анализ с использованием программы MICROCHECKER выявил вероятное присутствие нуль-аллелей, по крайней мере, в трех локусах (A8, L2, L69) с вариацией частот встречаемости от 0,124 до 0,713. После поправки ENA значения F_{st} немного изменились по этим локусам.

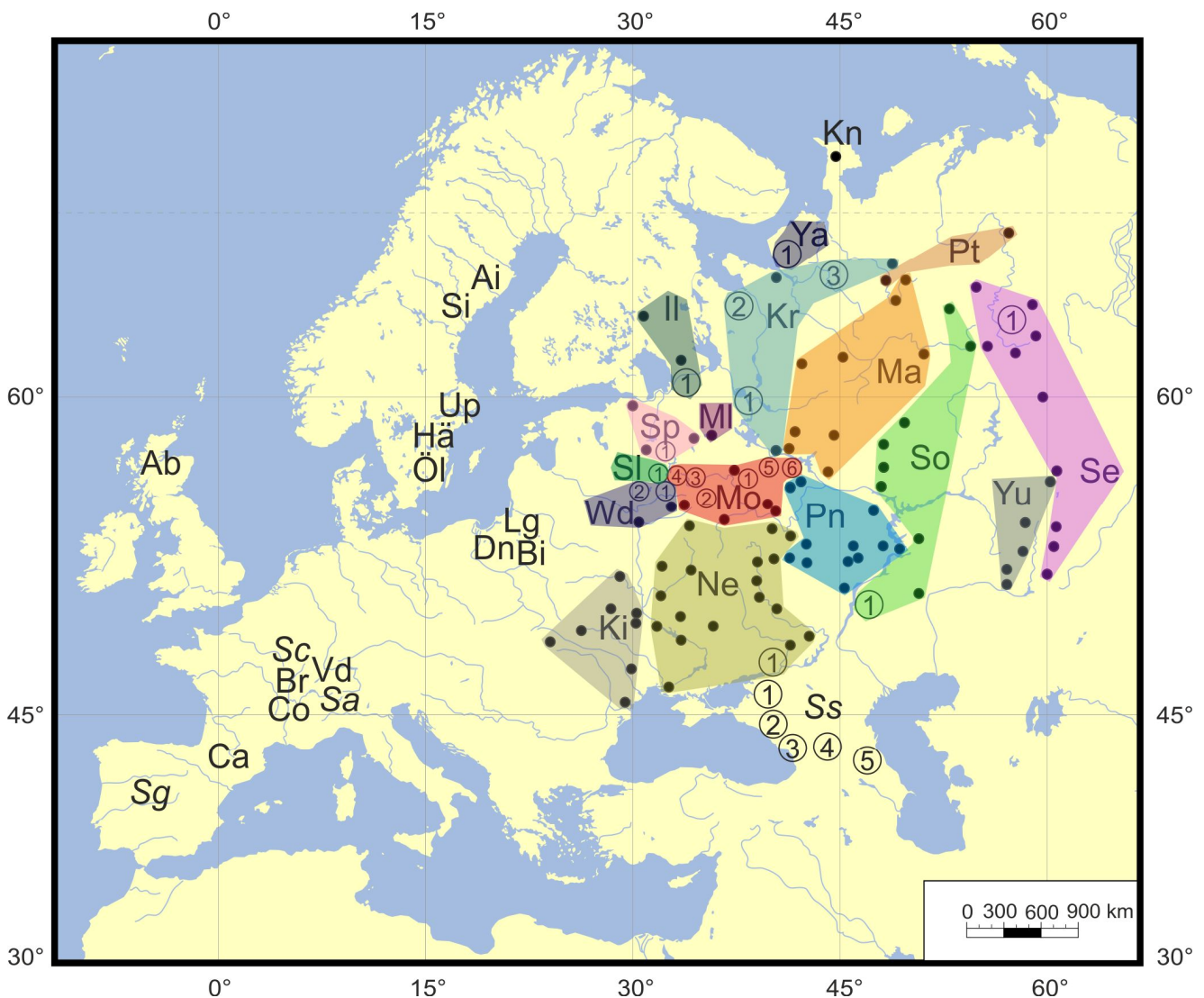


Рисунок 1. Происхождение образцов *S. araneus* и *S. satunini*, использованных в анализе ДНК. *Ss* – *S. satunini*, *Sc* – *S. coronatus*, *Sg* – *S. granarius*, *Sa* – *S. antinorii*. Так же латинскими буквами обозначены хромосомные расы *S. araneus*. Пункты сбора образцов: *Ss*1, *Wd*1-2, *Mo*1, 2, 4, 5, *Sl*1, *Sp*1, *Kr*1, *So*1, *Ne*1. Данные остальных образцов для анализа мтДНК взяты из Генбанка.

Таблица 1. Частоты аллелей исследованных микросателлитных локусов.*S.s.t.–S. s. tembotovi*

Локус	п.н.	Wd N=50	Mo N=43	Sl N=40	Sp N=10	Kr N=19	So N=18	<i>S.s.t.</i> N=14
A8	230	0,15	0,11	0,23	0,20	0,00	0,00	0,00
	240	0,59	0,83	0,66	0,70	0,79	0,86	0,86
	250	0,26	0,06	0,11	0,10	0,21	0,14	0,14
B30	185	0,74	0,87	0,70	0,85	0,76	0,78	0,90
	189	0,18	0,07	0,27	0,10	0,04	0,13	0,00
	192	0,08	0,07	0,03	0,10	0,20	0,09	0,10
L2	100	0,09	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	137	0,87	0,94	0,93	1,00	0,95	0,90	0,00
	142	0,04	0,03	0,07	0,00	0,05	0,10	0,00
L9	150	0,15	0,21	0,03	0,05	0,24	0,38	0,19
	160	0,11	0,24	0,10	0,15	0,00	0,19	0,06
	180	0,44	0,21	0,18	0,25	0,29	0,00	0,13
	190	0,3	0,24	0,53	0,40	0,33	0,31	0,63
	200	0	0,1	0,18	0,15	0,14	0,12	0
L16	132	0,09	0,02	0,08	0,00	0,20	0,13	0
	148	0,73	0,67	0,89	0,95	0,63	0,60	0,74
	164	0,18	0,32	0,04	0,05	0,17	0,27	0,26
L62	200	0,45	0,36	0,41	0,56	0,37	0,10	0,12
	210	0,55	0,64	0,60	0,44	0,63	0,90	0,88
L67	110	0,35	0,36	0,36	0,30	0,00	0,00	0,24
	135	0,46	0,56	0,59	0,60	0,83	1,00	0,62
	160	0,19	0,08	0,05	0,10	0,17	0,00	0,14
L69	100	0,19	0,21	0,32	0,39	0,15	0,16	0,06
	114	0,06	0,02	0,02	0,11	0,27	0,00	0,17
	120	0,45	0,23	0,09	0,17	0,54	0,79	0,78
	126	0,3	0,53	0,57	0,33	0,04	0,05	0
D103	230	0,02	0,07	0,11	0,10	0,31	0,00	0
	240	0,04	0,09	0,21	0,25	0,38	0,15	0
	250	0,58	0,42	0,40	0,40	0,31	0,56	1
	260	0,32	0,31	0,24	0,25	0,00	0,26	0
	270	0,04	0,11	0,03	0,00	0,00	0,04	0
D106	161	0,24	0,18	0,35	0,15	0,17	0,22	0
	168	0,27	0,33	0,37	0,55	0,21	0,67	0,36
	174	0,49	0,48	0,28	0,30	0,63	0,11	0,64
D107	220	0,18	0,06	0,01	0,00	0,22	0,12	0,07
	230	0,59	0,44	0,64	0,45	0,78	0,72	0,93
	240	0,18	0,2	0,11	0,45	0,00	0,16	0
	250	0,04	0,22	0,19	0,10	0,00	0,00	0
	260	0	0,08	0,04	0,00	0,00	0,00	0

Генетическое разнообразие *S. s. tembotovi*. У бурозубки Темботова не обнаружено более половины аллелей, отмеченных у обыкновенной бурозубки (16 аллелей, 60%). Однако следует учитывать малый размер выборки этой формы ($N = 12$). Интересным оказалось обнаружение диагностического аллеля L2 – по нему образцы бурозубки Темботова не проходят амплификацию (Григорьева и др., 2010; Григорьева, Шестак, 2010).

В то время как для рас обыкновенной бурозубки общее количество аллелей на локус колебалось от 1 до 5, для бурозубки Темботова было характерным наличие одного-двух аллелей (табл. 1). Анализ частот указывает на то, что локусы не сцеплены между собой. Откорректированное по минимальному размеру выборки число аллелей на локус (\bar{A}_c) у бурозубки Темботова также достоверно ниже. Уникальных аллелей у бурозубки Темботова не отмечено, что может быть связано с небольшим размером выборки и низким уровнем полиморфизма исследованной популяции (Григорьева, Сычева, 2011). Для данного подвида характерен невысокий уровень инбридинга и небольшой дефицит гетерозигот, наблюдаемая гетерозиготность была ниже, чем в выборках обыкновенной бурозубки (табл. 2).

3.2. Генетическая структура

Значения индексов фиксации (F_{st}) исследованных хромосомных рас указывают на умеренное генетическое дифференцирование (табл. 2). Большими оказались значения F_{st} при анализе выборок, где точный G -тест выявил различия по большинству локусов. Значения F_{st} близки к значениям R_{st} , однако, по локусам D103 и D107 значения R_{st} оказались значительно выше. Возможно, это свидетельствует о большей скорости мутирования данных локусов. И наоборот, невысокие значения R_{st} локусов B30 и L67 указывают на низкую скорость их мутирования.

При анализе различий внутри хромосомных рас индексы фиксации оказались выше таковых между расами (табл. 2). Общие значения G -теста подтверждают сильное дифференцирование трех рас гибридной зоны ($P < 0,0002$). Таким образом, генетическое дифференцирование внутри рас оказалось сильнее, чем между ними. Сходные данные были получены при анализе различий между польскими, шведскими расами (Wyttenbach *et al.*, 1999; Jadwischczak *et al.*, 2006; Polly, 2007).

Таблица 2. Значения F - и R -статистики для анализа локалитетов (19 выборок), всех рас в целом (6 выборок) и каждой по отдельности. ДИ – доверительный интервал. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

	F_{is}	95% ДИ	Точный G-тест	F_{st}'	95% ДИ	R_{st}
Хр. расы	0,286***	0,112–0,420	***	0,076	0,057–0,119	0,075
Локалитеты	0,257***	0,080–0,396	***	0,124	0,090–0,141	0,101
Wd (N=50)	0,412***	0,332–0,471	***	0,156	0,004–0,260	0,063
Mo (N=43)	0,349***	0,262–0,418	***	0,087	0,011–0,118	0,072
Sl (N=40)	0,253***	0,146–0,335	***	0,089	0,017–0,174	0,057
Sp (N=10)	0,361***	0,112–0,473	–	–	–	–
Kr (N=19)	0,265***	0,131–0,339	–	–	–	–
So (N=18)	0,076	0–0,132	–	–	–	–
<i>S. s.t.</i> (N=14)	0,126	0–0,301	–	–	–	–

Примечание. *S.s.t.*–*S. s. tembotovi*. Хромосомные расы: Wd– Западная Двина, Mo– Москва, Sl– Селигер, Sp– Санкт-Петербург, Kr– Кириллов, So– Сок. Хромосомные расы Санкт-Петербург, Кириллов и Сок были представлены одной популяцией, поэтому их структурный анализ не представлялся возможным. Значения F_{st}' после поправки ENA

Данные парных генетических различий свидетельствуют о слабых различиях рас Валдайской возвышенности (табл. 3, Mo, Wd, Sl, Sp). Наиболее генетически близкими оказались расы Селигер и Санкт-Петербург. Расы Кириллов и Сок оказались максимально удалены от рас Валдайской возвышенности.

Генетические дистанции между *S. araneus* и *S. s. tembotovi* оказались значительно выше, чем между расами обыкновенной бурозубки (табл. 3). Очевидно, в зоне контакта ареалов этих видов генный поток прерван.

Таблица 3. Оценка генетических дистанций по данным парных F_{st} . Курсивом даны значения F_{st}' после поправки ENA. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. *S.s.t.–S. s. tembotovi*

Раса	Wd N=50	Mo N=43	Sl N=40	Sp N=10	Kr N=19	So N=18	<i>S. s.t.</i> N=14
Wd	–	0,0436**	0,0555**	0,0263**	0,0746**	0,1538**	0,206***
Mo	0,0375	–	0,0327**	0,0176	0,0928**	0,1412**	0,278***
Sl	0,0402	0,0379	–	0,0028	0,1225**	0,1691**	0,276***
Sp	0,0305	0,0301	0,0093	–	0,1110**	0,1746**	0,339***
Kr	0,0909	0,0893	0,1178	0,1105	–	0,1241**	0,293***
So	0,1619	0,1378	0,1620	0,1709	0,1160	–	0,357***
<i>S. s.t.</i>	0,2302	0,2872	0,2850	0,3514	0,3144	0,3644	–

Несмотря на генетическое сходство хромосомных рас, контактирующих на Валдайской возвышенности, показатели числа мигрантов между ними по микросателлитным локусам были низкими. Подобные данные наводят на мысль об уменьшении потока генов между хромосомными расами и изолирующем эффекте гибридных зон. Тем не менее, число мигрантов внутри исследованных рас оказалось меньшим, чем между ними. Полученные данные указывают на то, что узкие гибридные зоны не ограничивают поток генов между расами.

3.3. Изоляция расстоянием

Тест Мантела не выявил значительной корреляции между генетическими и географическими дистанциями (коэффициент корреляции $R= 0,182$, $P= 0,150$) при анализе всех выборок. Еще меньшей оказалась корреляция между генетической дистанцией и принадлежностью выборки к определенной расе ($R= 0,08$, $P= 0,277$). Вероятно, слабая корреляция может быть объяснена значительным потенциалом расселения обыкновенной бурозубки и преградпроницаемостью межрасовых гибридных зон для нейтральных аллелей.

Также не выявлено корреляции между генетическими и географическими дистанциями выборок хромосомной расы Западная Двина ($R= 0,078$, $P= 0,351$).

Однако достоверная корреляция географических и генетических дистанций наблюдалась между выборками хромосомной расы Москва ($R= 0,535$, $P= 0,019$). Если исключить выборки из г. Иваново и г. Плес, коэффициент корреляции становится низким, недостоверным ($R= 0,098$, $P= 0,324$). Таким образом, максимальный вклад в корреляцию внесли выборки из Ивановской области, что свидетельствует о существовании географической изменчивости расы Москва.

3.4. Островная изоляция

Для изучения процессов изоляции нами была сопоставлена генетическая изменчивость частично изолированной популяции хромосомной расы Сок с популяциями *S. araneus* на сплошном ареале вида в лесной зоне и ленточным поселением подвида кавказской бурозубки, бурозубки Темботова.

Популяция расы Сок Дьяковского леса в зоне сухих степей по левобережью Волги (рис 1, So1) по гетерозиготности и среднему числу аллелей на локус не отличается от популяций обыкновенной бурозубки лесной зоны, а коэффициент инбридинга даже оказывается значительно меньшим. Напротив, низкая генетическая изменчивость популяции бурозубки Темботова имеет все особенности, характерные для малых изолированных популяций – низкую наблюдаемую гетерозиготность и аллельное разнообразие (см. выше). Тест на «бутылочное горлышко» не выявил резкого падения численности в прошлом хромосомных рас Валдайской возвышенности. Популяция Дьяковского леса также не проходила в прошлом «бутылочного горлышка». Напротив, все тесты с высокой степенью достоверности выявили резкое падение численности в прошлом популяции бурозубки Темботова. Умеренная генетическая изменчивость по микросателлитной ДНК может быть индикатором достаточной численности популяции Дьяковского леса для устойчивого существования. Напротив, приведенные данные показывают, что ленточные поселения бурозубки Темботова отличаются низкой гетерозиготностью, в них утрачивается аллельное разнообразие и велики колебания численности. В последние две тысячи лет (субатлантический период голоцена) изоляция популяций бурозубки Темботова могла усилиться за счет распространения сухих степей Восточной Европы на равнинах Предкавказья.

Глава 4. Изменчивость гена цитохрома *b* в популяциях

S. araneus s. str. и *S. satunini*Ogn.

4.1. Характеристика последовательностей гена цитохрома *b*

В результате анализа полученных нами последовательностей гена цитохрома *b* было обнаружено 79 вариабельных позиций у изучаемых образцов *S. araneus*(162 (17%) вариабельных позиций во всей выборке, включающей данные из Генбанка) и 56 вариабельных позиций у *S. satunini*(94 во всей выборке). Число гаплотипов, обнаруженных у *S. araneus*, было равно 43 (80 во всей выборке), в то время как у *S. satunini* было выявлено лишь три гаплотипа (13 во всей выборке). Большинство замен были синонимичными(68,35% у *S. araneus*, 94,44% у *S. satunini*), являлись транзициями(104 из 162 у *S. araneus*, 89 из 94 у *S. satunini*). Выявлен дефицит гуанина (13,76%) при сбалансированности остальных нуклеотидов (29,00% тимина, 29,09% цитозина, 28,15% аденозина).

Гаплотипическое разнообразие *S. araneus*(N=61) составило $0,9797 \pm 0,0111$, нуклеотидное – $0,00905 \pm 0,0047$. В выборке *S. satunini*(N=25) гаплотипическое разнообразие составило $0,920 \pm 0,029$, нуклеотидное – $0,03431 \pm 0,0087$. Такое высокое генетическое разнообразие *S. satunini* является следствием подразделенности выборки (табл. 4).

4.2. Филогеография обыкновенной бурозубки *S. araneus* s. str.

Медианная сеть филогенетических отношений отражает «звездообразную» филогению (рис. 2, 3). Наиболее распространенный гаплотип обнаружен у 17 особей разных хромосомных рас (15,7 % от общего количества особей *S. araneus*) и служит центром «звездообразной» филогении (рис. 2, 3). Он обозначен нами как «центральный». Среди современных гаплотипов сyt *b* «центральный» можно рассматривать как эволюционно более древний, судя по крайне широкой географии его распространения.

Звездообразная филогения выявлялась во многих исследованиях *S. araneus*(Ratkiewicz *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 2005; White., Searle, 2008; Распопова, Щипанов, 2011) и может быть следствием накопления изменений в больших открытых популяциях, последующего прохождения популяций через стадию

Таблица 4. Гаплогруппы (h) и нуклеотидное(π) разнообразие гена цитохрома b

Выборки, филогруппы	Число	Число	Гаплогруппы	Гаплогруппы	Нуклеотидное	Источник полученных данных
	особей, n	гаплогрупп, nh	разнообразие (h) \pm С.О.	разнообразие ($\pi \times 10^3$) \pm С.О.		
Западная Двина, ЕФ	14	9	0,879 \pm 0,079	4,42 \pm 1,21	эта работа	
Москва, ЕФ	15	13	0,975 \pm 0,035	5,26 \pm 3,02	эта работа	
Селигер, ЕФ	10	8	0,933 \pm 0,077	5,27 \pm 3,64	эта работа	
Санкт-Петербург, ВФ	4	4	1 \pm 0,177	6,51 \pm 4,68	эта работа	
Нерусса, АФ	6	6	1 \pm 0,096	4,20 \pm 2,07	эта работа	
Сок, ЕФ	13	8	0,859 \pm 0,089	7,26 \pm 4,11	эта работа	
Иломантси	2	2	1 \pm 0,272	4,21 \pm 3,58	эта работа	
Серов	4	4	1 \pm 0,127	10,71 \pm 7,12	эта работа	
Кириллов, ЕФ	8	4	0,643 \pm 0,184	1,31 \pm 1,19	эта работа	
Кириллов, БФ	8	8	1 \pm 0,063	11,14 \pm 6,48	эта работа	
Ягры, БФ	3	3	1 \pm 0,272	4,94 \pm 4,12	эта работа	
Шведские расы, ЕФ	150	40	0,705 \pm 0,043	3,16 \pm 0,35	Andersson <i>et al.</i> , 2005	
Польские расы, ЕФ	28	21	0,928	3,50 \pm 2,00	Ratkiewicz <i>et al.</i> , 2002	
Швейцарские расы, ЕФ	38	32	0,996 \pm 0,009	15,65 \pm 2,30	Yannic <i>et al.</i> , 2008	
Шотландские расы, ЕФ	95	78	0,979 \pm 0,004	4,64 \pm 0,27	White, Searle, 2008	
<i>S. granarius</i>	4	4	0,9 \pm 0,161	2,10 \pm 1,65	эта работа	
<i>S. antinorii</i>	2	2	1,0000 \pm 0,096	4,07 \pm 2,74	эта работа	
<i>S. satunini</i> тип В	16	8	0,883 \pm 0,045	2,55 \pm 1,67	эта работа	
<i>S. satunini</i> тип А	10	5	0,756 \pm 0,129	10,34 \pm 5,85	эта работа	
<i>S. coronatus</i>	4	4	1 \pm 0,177	15,00 \pm 10,23	эта работа	

Примечание. Стандартные ошибки (С.О.) рассчитаны, где это было возможно, после 1000 бутстреп-реплик. В источниках указаны ссылки на работы, из которых взяты данные, остальные данные были получены при анализе собственных последовательностей ДНК и последовательностей, депонированных в Генбанке. ЕФ – Европейская филогруппа. АФ – Азовская. ВФ – Валдайская. БФ – Беломорская

«бутылочного горлышка», что подтверждается анализом аминокислотных последовательностей, и, вследствие этого, повышения частоты встречаемости одного гаплотипа и в дальнейшем быстрого расселения и нарастания численности (Slatkin, Hudson, 1991; Rogers, Harpending, 1992).

При современном уровне изученности изменчивости гена цитохрома *b* все хромосомные расы, в которых встречается «центральный» и близкие к нему гаплотипы, предлагается отнести к единой Европейской филогруппе (ЕФ, рис. 2, 3).

Наряду с ЕФ в Восточной Европе обнаруживаются относительно небольшие региональные филогруппы, гаплотипы которых отличаются от «центрального» на 6-24 мутаций. Они отражают длительную независимую эволюцию отдельных популяций (в изоляции).

Ранее было показано, что гаплотипы гена *b* хромосомных рас Кириллов и Ягры (рис. 1, Ya1, Kг 1, 2) образуют отдельный кластер (Balakirev *et al.*, 2007). На медианной сети данная «Беломорская группа» удалена от «центрального» гаплотипа на 7 нуклеотидных замен (рис. 2). На вероятность длительной изоляции Северо-востока Европы ледниковыми процессами указывают некоторые геоморфологические особенности этого региона (Марков и др., 1965).

Отдельную филогруппу образует южная популяция расы Санкт-Петербург в окрестностях г. Валдай (рис. 1, Sp1). Данная филогруппа (Валдайская филогруппа, ВФ, рис. 2) удалена от «центрального» гаплотипа на 6 шагов мутаций. Гаплотипы внутри группы отличаются на 3-9 нуклеотидных замен. Современный ареал расы Санкт-Петербург целиком лежит в области последнего ледникового щита и даже в области одной из последних ледниковых стадий – вепсовской (15,2 тыс. л.н.), поэтому есть все основания полагать, что эта раса пережила последнее ледниковье в рефугиумах в пределах ледникового щита.

На 9 шагов мутаций от «центрального» гаплотипа отделена филогруппа островной популяции хромосомной расы Нерусса (рис. 1, Ne1) в южной части дельты р. Дон (Азовская филогруппа, АФ, рис. 2). Характерным для АФ, как и для ВФ, является отсутствие общего гаплотипа и резкая дифференциация внутри группы. Подобные отличия вряд ли могут быть связаны с ее современной островной

приуроченностью. Возможно, на острове сохранилась автохтонная популяция южнорефугиума расы Нерусса в последнее ледниковье. Известно, что в северном Приазовье на территории Донецкого кряжа на максимальной стадии последнего ледниковья (24-18 тыс. л. н.) сохранялся рефугиум лесной растительности (Эволюция экосистем Европы ..., 2008).

Лесной изолят популяции хромосомной расы Сок, т.н. «Дьяковский лес», находится в зоне сухих степей по р. Еруслан в Саратовской области. Для этой популяции бурозубок хромосомной расы Сок из Дьяковского леса (рис. 1, So1, N = 8) характерен свой общий гаплотип, удаленный от центрального на 3 шага мутаций (рис. 3). Он встречается с частотой более 62,5% у бурозубок Дьяковского леса и у 38,5% всей исследованной выборки хромосомной расы Сок. У двух бурозубок из Дьяковского леса отмечен другой общий гаплотип, отличающийся от центрального на 2 мутационные замены. Выборка из Дьяковского леса характеризуется низким гаплотипическим и нуклеотидным разнообразием ($h = 0,61$, $\pi = 0,0026$) по сравнению со всей выборкой расы Сок ($h = 0,86$, $\pi = 0,0073$), что характерно при длительном сохранении низкой численности или прохождении популяцией в прошлом стадии «бутылочного горлышка».

Таким образом, характеристика изменчивости этой популяции по гаплотипам гена *cut b* и микросателлитным локусам существенно отличается. Отмеченное различие может быть следствием меньшей скорости накопления мутаций гена *cut b* по сравнению с микросателлитными локусами. Очевидно, за время после прохождения популяцией Дьяковского леса стадии «бутылочного горлышка» (резкого падения численности или эффекта основания популяции небольшим числом особей) гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие гена *cutb* изменилось мало и осталось низким. Напротив, изменчивость микросателлитных локусов за это время восстановилась и сравнялась с уровнем изменчивости других популяций.

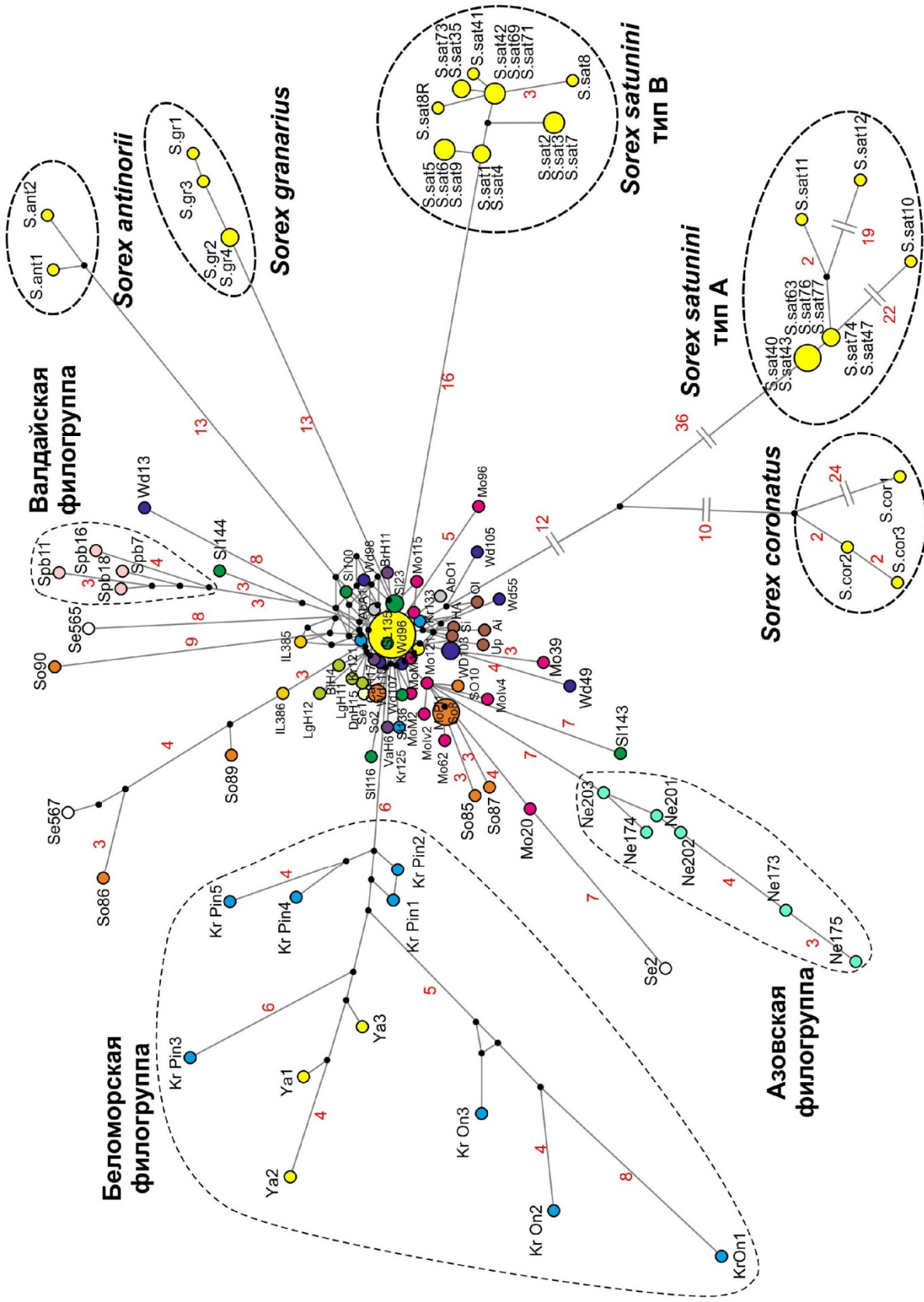


Рисунок 2. Медианная сеть митохондриальных гаплотипов рода *Sorex*. Размер круга пропорционален числу гаплотипов. Расстояния между кругами пропорциональны числу мутаций (отмечены цифрами).

Результаты трансляции гена цитохрома*b*. В результате трансляции гена цитохрома *b* длиной в 953 п.н. был получен белок, состоящий из 317 аминокислот. Обнаружено 25 аминокислотных замен у *S. araneus* и 6 замен в исследованной выборке *S. satunini*, часть из них радикальна по полярности, однако, локализуется в промежуточных областях трансмембранных доменов и не подвержена селективному отбору. Таким образом, мы не обнаружили свидетельства селективного преимущества «центрального» гаплотипа. Наблюдаемое распределение гаплотипов является следствием дрейфа генов в популяциях.

4.3. Филогеография краевых видов надвида *S. araneus*

На медианной сети криптическим видам соответствуют филогруппы. Так, выделяется филогруппа иберийской бурозубки, *S. granarius*, отличающаяся 14 заменами от *S. araneus* (p -дистанция 1,8%) и филогруппа бурозубки Бонапарта, *S. antinorii*, отстоящая на 16 шагов мутаций (p -дистанция 2,3%). Обе филогруппы интересны тем, что даже при малой дивергенции в 2%, имеются основания выделять их в самостоятельные виды. Столь небольшая дистанция (Beker, Bradley, 2006) не может служить критерием генетического вида, а число таких филогрупп может быть не меньше числа современных видов млекопитающих.

Отдельную филогруппу с p -дистанцией в 3,3% и отличающуюся от *S. araneus* на 24 замены, образует хорошо дифференцированный вид *S. coronatus*.

У *S. satunini* обнаружено две филогруппы, закавказская и северокавказская (Банникова, Лебедев, 2010), обе гаплогруппы (*A* и *B*) выявлены в одной популяции *S. s. tembotovi* (Орлов и др., 2010, 2011). Первая, типа *A*, – наиболее генетически удаленная (p -дистанция с *S. araneus* 5,7%, 50 замен), рассматривается как исходная для вида. Вторая представлена гаплотипами типа *B*, генетически близкого к *S. araneus*, как *S. antinorii* и *S. granarius* (p -дистанция с *S. araneus* 2,2%, 17 замен).

Выдвинута гипотеза, что гаплотипы типа *B* были получены от какого-то близкого к *S. araneus* краевого вида в Южной или Западной Европе. Судя по слабой дифференциации гаплотипов этой группы, ее последняя фиксация произошла сравнительно недавно, в позднем плейстоцене. Вероятнее всего, это был именно момент интрогрессии.

Глава 5. Независимость эволюции кариотипа и молекулярных особенностей

5.1. Накопление и фиксация в популяциях обыкновенной бурозубки хромосомных и молекулярных мутаций

В настоящее время среди цитогенетиков распространено мнение о возникновении хромосомных рас обыкновенной бурозубки в последнее ледниковье (Searle, 1984; Wójcik, 1993, Поляков и др., 2001). Это гипотетическое предположение не было подтверждено какими-либо фактическими данными. Первые полученные нами данные о филогруппах обыкновенной бурозубки указывают на плейстоценовый возраст некоторых хромосомных рас и противоречат мнению о формировании хромосомных рас в послеледниковье.

5.2. Эволюция хромосомных наборов и гена цитохрома *bv* надвиде

S. araneus

В разделе рассматриваются особенности возникновения и распространения хромосомных перестроек краевых видов рода *Sorex*. Медианная сеть показывает первоначально общую эволюционную историю краевых видов *S. coronatus* и *S. satunini* и их последующую дивергенцию на стадии 14 общих замен (рис. 2). Сходство кариотипов этих видов по 4 хромосомным перестройкам (*tu*, *af*, *lo*, *jn*) также подтверждает общую эволюционную историю этих видов.

Заключение

В результате выполненной работы нам не удалось обнаружить генетических различий между выборками хромосомных рас обыкновенной бурозубки по аллелям микросателлитных локусов. По данным мтДНК отдельными филогруппами были представлены выборки рас Санкт-Петербург и Нерусса. Среди остальных выборок хромосомных рас не представлялось возможным выделить филогруппы.

Основываясь на данных медианной сети, гаплотипического и нуклеотидного разнообразия, можно предположить, что в послеледниковье популяции бурозубок расселялись из рефугиумов на территории, которые становились пригодными для их существования.

Анализ последовательностей мтДНК близкого вида *S. satunini* позволил выделить две отдельные гаплогруппы. Вероятнее всего, дивергенция *S. satunini* и *S. coronatus* началась в раннем плейстоцене. Дивергенция гаплогруппы *S. satunini* типа В и *S. araneus* началась во время среднего плейстоцена, примерно в одно время с отделением *S. granarius* и *S. antinorii*.

Следует отметить слабое влияние хромосомных различий на генетическую структуру популяций. Видимо, при поддержке отбора фиксация транслокационных соединений хромосом в ледниковых изолятах вполне объяснима. Напротив, без поддержки отбора фиксация молекулярных признаков идет медленнее.

Выводы

1. Обнаружена значительная подразделенность популяций хромосомных рас Москва, Западная Двина и Селигер по микросателлитным аллелям, превышающая межрасовые различия.
2. Не выявлено достоверной корреляции между генетическими и географическими дистанциями. Не найдено гаплотипов *cytb* или аллелей микросателлитной ДНК, способных диагностировать хромосомные расы.
3. Не получено убедительных доказательств влияния узких гибридных зон на поток нейтральных аллелей и, следовательно, изолирующей роли хромосомных перестроек.
4. В частично изолированной популяции *S. araneus* лесного массива в зоне сухих степей Дьяковского леса низкую генетическую изменчивость по мтДНК и умеренную – по микросателлитной ДНК можно объяснить недостаточным временем с момента изоляции для накопления генетической изменчивости по мтДНК.
5. Гаплотипическое разнообразие гена *cytb* *S. araneus* высоко в отличие от низкого нуклеотидного. Филогенетические отношения между гаплотипами гена *cytb* обыкновенной бурозубки демонстрируют «звездообразную» структуру, «центральный» гаплотип можно рассматривать как эволюционно более древний, судя по крайне широкой географии его распространения.

6. В некоторых хромосомных расах *S. araneus* обнаруживаются филогруппы гена *cytb*, указывающие на плейстоценовый, а не послеледниковый возраст хромосомных рас.
7. В исследованной популяции *S. s. tembotovi* обнаружена низкая генетическая изменчивость как микросателлитной, так и митохондриальной ДНК, что может быть следствием ленточного расселения вида в междуречье Кубани и Дона.
8. У *S. s. tembotovi* отмечены две группы гаплотипов гена *cytb*. Первая группа, генетически наиболее обособленная в надвиде, рассматривается как исходная для *S. satunini*. Вторая, отстоит от *S. araneus* на такой же дистанции, как *S. antinorii* и *S. granariusi* может быть результатом интрогрессии от какой-то южноевропейской плейстоценовой формы, но не от современной или плейстоценовой *S. araneus* str.
9. Молекулярные признаки могут быть использованы для диагностики видов надвида *S. araneus*, но не хромосомных рас. Вероятно, они фиксируются в популяциях медленнее хромосомных, которые могут поддерживаться мейотическим отбором.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Журналы из перечня изданий, рекомендованных ВАК:

1. **Григорьева О.О., Сычева В.Б.** 2011. Генетическая и морфологическая изменчивость частично изолированной популяции кавказской бурозубки, *Sorex satunini* (Mammalia) // Генетика. Т. 47. № 9. С. 1271-1274.
2. **Григорьева О.О., Шестак А.Г., Потапов С.Г., Борисов Ю.М., Ирхин С.Ю., Кораблев Н.П., Орлов В.Н.** 2011. Полиморфизм микросателлитных локусов и поток генов в зоне контакта четырех хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L.(Mammalia) // Известия академии наук. Серия биологическая. № 5. С. 501-510.
3. **Григорьева О.О., Шестак А.Г., Сычева В.Б., Потапов С.Г., Борисов Ю.М., Орлов В.Н.** 2011. Изолирующий эффект узких гибридных зон хромосомных

рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* (Mammalia) // Доклады академии наук. Т. 436. № 6. С. 830-833.

4. Стахеев В.В., Балакирев А.Е., Григорьева О.О., Шестак А.Г., Потапов С.Г., Борисов Ю.М., Орлов В.Н. 2010. Распространение криптических видов бурозубок рода *Sorex* (Mammalia), диагностированных по молекулярным маркерам, в междуречье Дона и Кубани // Поволжский экол. журн. № 4. С. 396-403.

Другие издания:

5. Григорьева О.О., Опарин М.Л., Орлов В.Н. 2011. Генетическая структура изолированной популяции обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* L. (Mammalia), в островном лесу Поволжья // Труды биол. учебно-научного центра Воронежского гос. ун-та «Веневитиново». Воронеж: Воронежский гос. ун-т. Вып. 25. С. 35-42.
6. Григорьева О.О., Орлов В.Н. 2011. Независимость эволюции кариотипа и молекулярных особенностей в надвиде обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Mammalia) // Экология: сквозь время и расстояние. Матер. конф. мол. уч. Екатеринбург: Голицынский. С. 46-53.
7. Григорьева О.О., Шестак А.Г. 2010. Полиморфизм хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* и кавказской бурозубки *Sorex satunini* (Mammalia), выявляемый с использованием микросателлитных маркеров // Матер. четвертой конф. мол. сотр. и аспирантов ИПЭЭ им. А.Н. Северцова. М.: Т-во науч. изданий КМК. С. 89-95.
8. Григорьева О.О., Шестак А.Г. 2010. Использование микросателлитов для идентификации двух видов *Sorex araneus* и *Sorex satunini* (Mammalia) // Труды Томского гос. ун-та. Томск: Изд-во Томского ун-та. С. 331-333.
9. Григорьева О.О., Шестак А.Г., Потапов С.Г. 2010. Идентификация хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* и кавказской бурозубки *Sorex satunini* (Mammalia) с использованием микросателлитных маркеров // Целостность вида у млекопитающих: изолирующие барьеры и гибридизация. Матер. конф. М.: Т-во науч. изданий КМК. С. 32.

10. Орлов В.Н., Борисов Ю.М., Потапов С.Г., Балакирев А.Е., Андреева Т.А., **Григорьева О.О.**, Сычева В.Б. 2009. Фиксация замен в гаплотипах цитохрома *b* и направленное уменьшение числа групп сцеплений в популяциях *Sorex araneus* (Mammalia) // V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. С. 258.
11. Шестак А.Г., Балакирев А.Е., **Григорьева О.О.**, Потапов С.Г. 2010. Филогеография надвида обыкновенной бурозубки *Sorex araneus*: процессы интрогрессии и изоляции популяций // Целостность вида у млекопитающих: изолирующие барьеры и гибридизация. Матер.конф. М.: Т-о науч. изданий КМК. С. 98.
12. Шестак А.Г., **Григорьева О.О.** 2010. Полиморфизм митохондриального гена цитохрома *b* в области парапатрии трех хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* (Mammalia) // Матер.четвертой конф. мол. сотрудников и аспирантов ИПЭЭ им. А.Н. Северцова. М.: Т-во науч. изданий КМК. С. 373-378.
13. **Григорьева О.О.**, Шестак А.Г., Балакирев А.Е., Потапов С.Г., Борисов Ю.М. 2011. Независимость эволюции кариотипа и молекулярных особенностей в надвиде обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* // Териофауна России и сопредельных территорий. Матер.междун.совещания. С. 126.
14. **Grigoryeva O.** 2011. Karyotype reorganization and gene flow in inter- and intra-specific contact zones of the *Sorex araneus* superspecies // ECM 2011. Materials of the 6th European Congress of Mammalogy. P. 23.
15. **Grigoryeva O.O.**, Potapov S.G., Shestak A.G., Orlov V.N. 2010. Microsatellite polymorphism in chromosome races of *Sorex araneus* and in *Sorex satunini*// Advances in the biology of shrews III. Materials of the International Conference .Moscow: KMK. P.18.
16. Shestak A., **Grigoryeva O.**, Potapov S. 2010. Genetic variability of mtDNA cytochrome *b* in the contact zone of chromosome races of *Sorex araneus*// Advances in the biology of shrews III. Materials of the International Conference . Moscow: KMK. P.58.

Подписано в печать: 27.12.2011
Объем: 1,5 усл.п.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 603
Отпечатано в типографии «Реглет»
119526, г. Москва, Страстной бульвар, д. 6, стр. 1
(495) 978-43-34; www.reglet.ru