ПОВОЛЖСКИЙ ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ. 2010. № 4. С. 396 – 403

УДК 599.363(470.62/.67)

РАСПРОСТРАНЕНИЕ КРИПТИЧЕСКИХ ВИДОВ БУРОЗУБОК РОДА *SOREX* (MAMMALIA), ДИАГНОСТИРОВАННЫХ ПО МОЛЕКУЛЯРНЫМ МАРКЁРАМ, В МЕЖДУРЕЧЬЕ ДОНА И КУБАНИ

В.В. Стахеев [1], А.Е. Балакирев [2], О.О. Григорьева [2], А.Г. Шестак [2], С.Г. Потапов [2], Ю.М. Борисов [2], В.Н. Орлов [2]

[1] Институт аридных зон Южного научного центра РАН
Россия, 344006, Ростов-на-Дону, Чехова, 41
E-mail: stacheev@ssc-ras.ru
[2] Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН
Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 33
E-mail: orlovvic@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.02.10 г.

Распространение криптических видов бурозубок рода *Sorex* (Mammalia), диагностированных по молекулярным маркёрам, в междуречье Дона и Кубани. – Стахеев В.В., Балакирев А.Е., Григорьева О.О., Шестак А.Г., Потапов С.Г., Борисов Ю.М., Орлов В.Н. – Для диагностики двух пар криптических видов *Sorex araneus* L. – *S. satunini* Ogn. и *Sorex minutus* L. – *S. volnuchini* Ogn. использованы микросателлитные и мтДНК маркёры. Получены новые данные о распространении этих видов на равнине междуречья Дона и Кубани. Бурозубка Волнухина и кавказский крот в междуречье Дона и Кубани проникают на север до бассейна р. Ея. Эндемики Кавказа, бурозубки *S. satunini* и *S. volnuchini* широко распространены по долинам небольших рек на степной равнине. Оба вида наиболее многочисленны в луговых, кустарниковых и лесных биотопах. Не отмечено различий в предпочитаемых местообитаниях этих видов.

Ключевые слова: *Sorex*, *S. araneus*, *S. satunini*, *S. minutus*, *S. volnuchini*, цитохром *b*, микросателлитные локусы, криптические виды, распространение, местообитания.

Distribution of cryptic shrew species of the genus *Sorex* (Mammalia) on the plain between the Don and Kuban rivers with molecular marker diagnostics. – Stacheev V.V., Balakirev A.E., Grigoryeva O.O., Shestak A.G., Potapov S.G., Borisov Yu.M., and Orlov V.N. – Microsatellite and cytochrome b markers were used to identify two pairs of cryptic shrew species, namely, *Sorex araneus* L. – *S. satunini* Ogn., and *Sorex minutus* L. – *S. volnuchini* Ogn. New data on the distribution of these species on the plain between the Don and Kuban rivers have been obtained. The shrew *S. volnuchini* and Caucasian mole occur on the plain northward up to the Eya river. The endemic species of Caucasus, *S. satunini* and *S. volnuchini*, are wide-spread in the surveyed area alongside small streams on the steppe plain. Both *Sorex* species are most abundant in thick grass, bushy scrub, and deciduous woodlands. They display no clear differences in habitat preferences.

Key words: *Sorex*, *S. araneus*, *S. satunini*, *S. minutus*, *S. volnuchini*, cytochrome *b*, microsatellite locus, cryptic species, distribution, habitat.

ВВЕДЕНИЕ

Распространение некоторых эндемиков Кавказа выходит за пределы этого горного региона на Русскую равнину, но границы их ареалов и зоны контакта с близкими и географически замещающими видами остаются неизученными. Причи-

© В.В. Стахеев, А.Е. Балакирев, О.О. Григорьева, А.Г. Шестак, С.Г. Потапов, Ю.М. Борисов, В.Н. Орлов, 2010

на в том, что некоторые эндемики Кавказа контактируют на Русской равнине с сестринскими криптическими видами. Поэтому в степной равнинной части Западного Предкавказья севернее линии Краснодар – Майкоп – Отрадная – Черкесск остаются неясными границы ареалов таких пар криптических видов, как бурозубки обыкновенная и кавказская, *Sorex araneus* L. и *S. satunini* Ogn., и бурозубки малая и Волнухина, *Sorex minutus* L. и *S. volnuchini* Ogn.

Оба кавказских эндемика, бурозубки кавказская и Волнухина, первоначально рассматривались в качестве подвидов. Предположение о видовой самостоятельности кавказской бурозубки было высказано при исследовании гениталий самцов (Лаврова, Зажигин, 1965; Долгов, Лукьянова, 1966). Позже выяснилось, что кариотип кавказской бурозубки высоко специфичен, идентичен во всех исследованных популяциях Северного Кавказа и Закавказья и хорошо дифференцирует этот вид (Козловский, 1973 *а*; Соколов, Темботов, 1989). Бурозубка Волнухина (2 *n* = 40) отличается от малой (2 *n* = 42) небольшими особенностями кариотипа, в частности, одним центрическим соединением и положением центромеры Х-хромосомы (Козловский, 1973 *б*), поэтому ее репродуктивная изолированность оставалась неясной.

В настоящее время северную границу кавказской бурозубки и бурозубки Волнухина проводят в бассейне Кубани (Долгов, 1985; Соколов, Темботов, 1989), но из-за сложностей диагностики этих видов действительные границы распространения остаются невыясненными. Распространение кавказской бурозубки в изолятах на Ставропольской возвышенности было подтверждено кариологическими данными (Соколов, Темботов, 1989). Экземпляры из низовий Кубани одни авторы предположительно относили к кавказской (Лаврова, Зажигин, 1965; Соколов, Темботов, 1989), другие – к обыкновенной бурозубке (Окулова и др., 2005).

В статье представлены данные о распространении двух пар криптических видов бурозубок рода *Sorex* на равнине Западного Предкавказья, диагностированных по кариотипу и молекулярным маркёрам – гаплотипам мтДНК гена цитохром *b* и микросателлитным аллелям. В экологических исследованиях молекулярные маркёры значительно удобнее хромосомных, так как для молекулярного анализа пригодны любые ткани в минимальных количествах, фиксированные в спирте или высушенные (палец, кончик уха или хвоста).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Кавказские бурозубки (23 экз.) отловлены в Краснодарском крае в долине р. Бейсуг, окрестности пос. Первомайское (45º40′ /39º41′) в июне 2009 г. (рис. 1, *5*). Обыкновенные бурозубки (14 экз.) отловлены в окрестностях с. Кагальник Азовского района Ростовской области (научно-экспедиционная база «Кагальник» ЮНЦ РАН) на острове, непосредственно прилегающем к левому берегу дельты р. Дон (47º05′ / 39º18′); в окрестностях Ростова-на-Дону, пос. Большой Лог, долина р. Аксай (47º16′ / 39º55′) в августе 2009 г. и в долине р. Кагальник, окр. пос. Новониколаевки (46º59′ / 39º37′) в июне 2010 г. (рис. 1, *1*, *2*, *3*). Бурозубки Волнухина (22 экз.) отловлены в окрестностях пос. Первомайское (рис. 1, *5*) в июне 2009 г., в долине р. Мокрая Чубурка, Александровский лесхоз (46º45′ / 39º04′) (рис. 1, *4*) и в пос. Новониколаевке Ростовской области (рис. 1, *3*) в июне 2010 г. Малые буро-

зубки (8 экз.) отловлены в окрестностях пос. Большой Лог и с. Кагальник (рис. 1, *1*, *2*). В качестве материала сравнения были также использованы последовательности цитохрома *b* 10-ти видов рода *Sorex* (*S. granarius*, *S. coronatus*, *S. antinorii*, *S. araneus*, *S. satunini*, *S. volnuchini*, *S. minutus*, *S. caecutiens*, *S. minutissimus*, *S. alpinus*), депонированные в Генбанке.

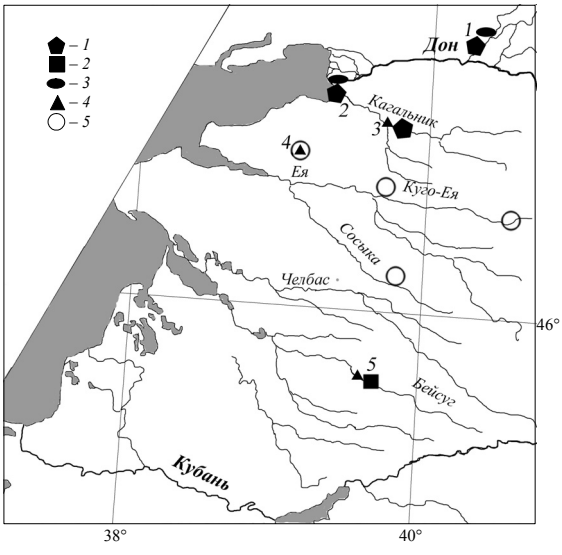

Рис. 1. Точки находок двух пар криптических видов бурозубок рода *Sorex*, диагностированных по кариотипу и молекулярным маркёрам, в междуречье Дона и Кубани и распространение кавказского крота, *Talpa caucasica* Sat., по нашим данным и в литературе (Зверозомб-Зубовский, 1923; Соколов, Темботов, 1989): *1* – *Sorex araneus* L., *2* – *S. satunini* Ogn., *3* – *S. minutus* L., *4* – *S. volnuchini* Ogn., *5* – *Talpa caucasica* Sat.

Хромосомные препараты приготовлены в полевых условиях по стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки. Идентификацию хромосом проводили как на тотально окрашенных препаратах, так и по рисунку дифференциально окрашенных хромосом (G-banding с использованием трипсина) в соответствии с международной номенклатурой хромосом обыкновенной бурозубки.

Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани печени, фиксированных в спирте, по методике с использованием фенол-хлороформа после предварительной обработки гомогенизированного образца протеиназой К. Фрагмент гена цитохром *b* длиной 1023 п.н. был амплифицирован с использованием пары универсальных праймеров H15915 и L14924. Секвенирование фрагмента проводилось в обоих направлениях с теми же праймерами, что и при рутинной PCR на секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) с использованием BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

Полученные последовательности выравнивались при помощи пакета программ BioEdit. Расчёты генетических дистанций и филогенетический анализ проводился в программе MEGA 4.

Исследованы 19 микросателлитных маркёров, из которых полиморфными оказались 11 (A8, B30, L2, L9, L16, L62, L67, L69, D103, D106, D107). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле в 1хТБЕ буфере при 300 В в течение 2 ч, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. В качестве маркёров длины фрагментов использовали стандарты молекулярной массы в 100 п.н. Статистический анализ проводили с использованием пакетов программ FSTAT v.2.9.3, GENEPOP v.4 и GENETIX v.4.02.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные маркёры двух пар криптических видов

Ранее мы описали набор дифференциально окрашенных (G-окраска) хромосом кавказской бурозубки (Орлов и др., 2010), хромосомная формула этого вида: XX/XY_1Y_2 *af*, *bc*, *gh*, *ik*, *jn*, *lo*, *m*, *p*, *q*, *r*, *tu.* От южных популяций обыкновенной бурозубки на Русской равнине кавказская бурозубка отличается не менее чем 8-ю хромосомными перестройками, в том числе соединениями *gh*, *ik*, *jn*, *lo*, положением центромеры хромосом *p*, *q*, *r* и перестроенным плечом *h*, причем распространение пяти хромосомных перестроек ограничено ареалом кавказской бурозубки.

Ряд общих перестроек, характерных для кавказской бурозубки и западноевропейских видов, *Sorex coronatus* Mil. (Франция) и *S. antinorii* Bon. (Альпы Италии), свидетельствует о существовании в отдельные периоды плейстоцена Европы общего предкового малоазийско-южноевропейский вида.

Обыкновенная и кавказская бурозубка хорошо отличаются по гаплотипам гена цитохром *b*. Филогенетические отношения в роде *Sorex* иллюстрирует NJ/ME-дерево гаплотипов этого гена (рис. 2). Из представленных данных видно, что бурозубки обыкновенная и кавказская представляют собой близкородственные сестринские виды, дивергировавшие от общего предка.

У обыкновенной бурозубки прослеживается несколько филогеографических линий (Balakirev et al., 2007) как следствие более широкой эволюционной экспансии этого вида на огромных пространствах Евразии. Неожиданным оказалось обнаружение в популяции кавказских бурозубок двух резко отличающихся типов гена цитохром *b*, которые мы назвали типами *A* и *B* (Орлов и др., 2010). Тип *B* сходен с гаплотипами *S. araneus*, в то время как тип *A* максимально удален (см. рис. 2).

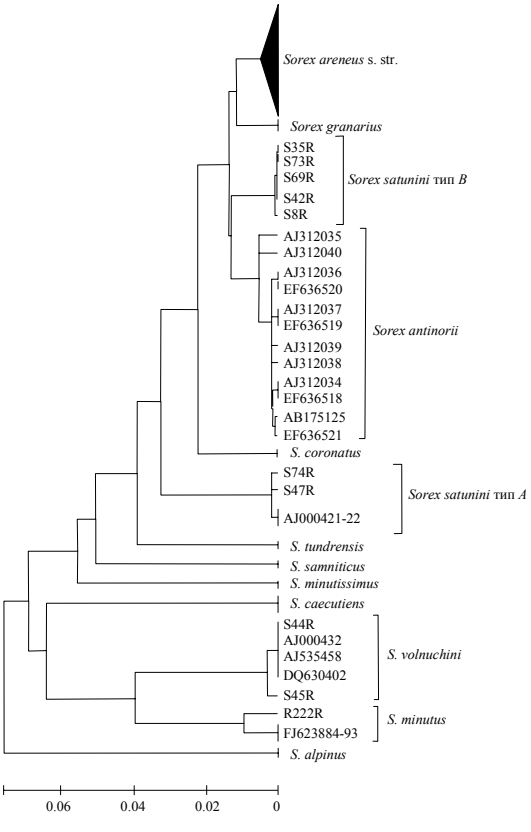

Рис. 2. Обобщённое NJ/ME-дерево митохондриальных гаплотипов гена цитохрома *b* европейских видов *Sorex*. В узлах приведены уровни поддержки (bootstrap-значения) для NJ и ME деревьев соответственно. Значения, равные 100, не приведены. Шкала внизу показывает масштаб генетической дивергенции

Тип *A* мы считаем исходным, эволюционировавшим на протяжении всей истории вида.

Кавказская и обыкновенная бурозубка хорошо отличаются также по аллелям микросателлитных локусов. В трех исследованных расах обыкновенной бурозубки отмечено 24 уникальных аллеля (61.5%), не встречающихся у кавказской бурозубки. Важно подчеркнуть, что в популяции кавказской бурозубки не обнаружено и современных митохондриальных гаплотипов обыкновенной бурозубки. Очевидно, в зоне контакта этих видов генный поток прерван.

Генетическая дистанция по микросателлитным локусам между обыкновенной и кавказской бурозубками оказалась в 3 – 4 раза выше, нежели между хромосомными расами обыкновенной бурозубки (табл. 1), и больше, чем между бурозубками обыкновенной и Бонапарта (*S. antinorii* Bon.). Дистанции между кавказской бурозубкой и другими видами надвида обыкновенной бурозубки по микросателлитным локусам аналогичны дистанциям по митохондриальным гаплотипам.

Таблица 1

Оценка генетических дистанций по данным парных генетических различий (F_{st})

Расы	Западная Двина	Москва	Селигер	*S. satunini*
Западная Двина	–	0.059*	0.076*	–
Москва	*0.049*	–	0.038*	–
Селигер	*0.062*	*0.042*	–	–
S. araneus	–	–	–	0.186*** *0.207*

Примечание. Курсивом даны значения F_{st} после поправки ENA. * – $P < 0.05$, *** – $P < 0.001$.

При этом генетическая изменчивость исследованной кавказской популяции резко снижена (табл. 2). Отмечен значительный дефицит гетерозигот микросателлитных локусов. По большинству локусов характерным было присутствие лишь одного аллеля. Низкий уровень полиморфизма кавказской бурозубки может быть следствием ленточного распространения этого вида по долинам небольших рек и лесополосам на равнине Западного Предкавказья.

Таблица 2

Генетическое разнообразие *S. araneus* и *S. satunini* по микросателлитным локусам

Виды и расы	N_a	H_o	H_e	F_{is}
S. satunini	15	0.086	0.222	0.633*
S. araneus	39	0.339	0.508	0.333*
Западная Двина	36	0.315	0.479	0.348*
Москва	38	0.315	0.475	0.343*
Селигер	38	0.374	0.498	0.253*

Примечание. N_a – количество аллелей, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F_{is} – коэффициент инбридинга, * – $P < 0.0002$.

Что касается второй пары криптических видов, бурозубок малой и Волнухина, то генетическая дистанция между ними по гаплотипам цитохрома *b* (0.079±0.009) значительно превышает дистанцию между гаплотипом обыкновенной бурозубки и типом *B* кавказской бурозубки (0.028±0.004) и близка к дистанции между обыкновенной бурозубкой и типом *A* кавказской (0.063±0.007) что, несомненно, указывает на видовую самостоятельность бурозубки Волнухина.

Распространение эндемичных видов бурозубок Кавказа в междуречье Дона и Кубани

По нашим данным обыкновенная бурозубка распространена в бассейне Дона и Кагальника (см. рис. 1, *1*, *2*, *3*). Эти самые южные популяции обыкновенной бурозубки относятся к хромосомной расе Нерусса с кариотипом XX/XY_1Y_2 *af*, *bc*, *go*, *hi*, *kr*, *mn*, *p*/*q*, *tu*. Ранее самые южные кариологически датированные популяции обыкновенной бурозубки хромосомной расы Нерусса были известны из Волгоградской области (Клетский) и Ростовской области (Белая Калитва) (Bystrakova et al., 2003). Бурозубок из долины нижнего Дона относили к обыкновенной бурозубке без кариологического анализа (Критская, 1962; Долгов, 1985). От ранее описанных из бассейна Дона бурозубок расы Нерусса исследованные нами популяции отличаются полиморфизмом мелкой пары метацентрических хромосом *pq*, представленной как метацентриком, так и отдельными акроцентриками *p* и *q*. Ранее полиморфизм расы Нерусса отмечался только в бассейне Днепра (Bulatova et al., 2000).

Датированные по кариотипу и молекулярным маркёрам сборы кавказской бурозубки указывают на то, что этот вид распространен не только по долине Кубани, но и севернее в бассейне р. Бейсуг (см. рис. 1, *5*), откуда был впервые описан набор дифференциально окрашенных (G-окраска) хромосом этого вида (Орлов и др., 2010).

Самые южные популяции малой бурозубки, датированные по кариотипу (2 n = = 42) и гаплотипам цитохрома *b*, обнаружены по нижнему течению Дона в тех же биотопах, что и обыкновенная бурозубка (см. рис. 1, *1*, *2*).

Южнее, в долине рек Кагальник, Мокрая Чубурка и Бейсуг (см. рис. 1, *3* – *5*) обнаружена бурозубка Волнухина (2 n = 40). Очевидно этот вид распространен на север по Азово-Кубанской низменности до междуречья Кагальника и Дона.

Таким образом, по нашим данным распространение эндемичных видов бурозубок Кавказа не ограничено на севере бассейном р. Кубань. Судя по тому, что кавказский крот отмечен значительно севернее в бассейнах всех основных рек Азово-Кубанской низменности – Челбас, Сосыка и Ея (Соколов, Темботов, 1989) (см. рис. 1), а бурозубка Волнухина обнаружена по р. Мокрая Чубурка, возможны также изолированные ленточные поселения бурозубок кавказской и Волнухина по долинам всех рек Азово-Кубанской низменности. В этом случае северные границы ареалов кавказских эндемиков и зоны контакта с близкими видами, замещающими их на Русской равнине, проходят в междуречье Еи и Кагальника.

Современные эндемичные виды бурозубок Кавказа обнаруживаются со среднего плейстоцена, пещера Кударо 1, 360 тыс. л. н. (Осипова, 2006). Определение ископаемого материала облегчается тем, что эти виды были представлены в плейстоцене формами, близкими современным (Зайцев, Осипова, 2004; Осипова, 2006), но выяснение их прошлого распространения за пределами Кавказа достаточно проблематично.

Ареалы эндемиков Кавказа и близких к ним видов Русской равнины, вероятнее всего, были разобщены на протяжении всего позднего плейстоцена (Валдайская холодная эпоха, последние 100 тыс. лет) сухими степями с интенсивным эоловым выветриванием (Величко и др., 1993; Эволюция экосистем Европы…, 2008;

Markova et al., 1995). Сближение ареалов этих географически замещающих видов могло происходить в климатические оптимумы голоцена, например, в атлантический период (6200 – 5000 л. н.) и в начале субатлантического периода (2200 – 1800 л. н.), когда в Причерноморье и Предкавказье резко сокращалась зона степей и распространялись лесостепные экосистемы. Напротив, за последние 2 тыс. лет на равнинах Предкавказья распространились сухие степи Восточной Европы, поэтому могла усилиться изоляция географически замещающих видов Русской равнины и Кавказа.

Биотопическое размещение двух пар криптических видов бурозубок (обыкновенная – кавказская и малая – Волнухина) в степной зоне Азово-Кубанской равнины ограничено мезофильными участками с луговой и лесной растительностью, преимущественно по долинам рек и лесополосам. Эндемики Кавказа, бурозубки кавказская и Волнухина, в долине р. Бейсуг встречаются совместно в одних биотопах, таких как участки с древесно-кустарниковой и луговой растительностью в пойме. Такое распределение значительно отличается от описанного ранее в плавневой зоне Приазовья, где бурозубка Волнухина отмечена только в наиболее мезофильных участках, на пастбищах в тростниках и в плавнях (Лаврова, Зажигин, 1965). Оба вида, вероятно, конкурируют с малой белозубкой, потому что редки на участках с высокой численностью последней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (*проект № 09-04-00530*), *программы ФИ Президиума РАН* «*Биологическое разнообразие*» *и ФЦП* «*Научные и научно-педагогические кадры инновационной России*» (*проект № 2009-1.1-141-063-021*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Величко А.А., *Борисова О.К.*, *Доскач А.Г.*, *Морозова Т.Д.*, *Спасская И.И.*, *Фаустова М.А.* Русская равнина // Развитие ландшафтов и климата Северной Евразии: Поздний плейстоцен-голоцен. М.: Наука, 1993. С. 11 – 20.

Долгов В.А. Бурозубки Старого Света. М.: Изд-во МГУ, 1985. 219 с.

Долгов В.А., *Лукьянова И.В.* О строении гениталий палеарктических бурозубок как систематическом признаке // Зоол. журн. 1966. Т. 45, № 12. С. 1852 – 1861.

Зайцев М.В., *Осипова В.А.* Насекомоядные млекопитающие позднего плейстоцена Северного Кавказа // Зоол. журн. 2004. Т. 83, № 7. С. 851 – 868.

Зверозомб-Зубовский Е.В. К познанию фауны млекопитающих Донской области. Материалы по естественно-историческому изучению Края. Ростов н/Д: Типография Штаба С.К.В.О., 1923. 23 с.

Козловский А.И. Соматические хромосомы двух видов землероек-бурозубок Кавказа // Зоол. журн. 1973 *а*. Т. 52, № 5. С. 571 – 576.

Козловский А.И. Результаты кариологического обследования аллопатрических форм малой бурозубки (*Sorex minutus*) // Зоол. журн. 1973 *б*. Т. 52, № 3. С. 390 – 397.

Критская Т.И. О землеройках Ростовской области // Научные доклады высшей школы. Биол. науки. 1962. №4. С. 46 – 49.

Лаврова М.Я., *Зажигин В.С.* О систематике и биологии землероек Краснодарского края с оценкой их роли в лептоспирозных очагах // Зоол. журн. 1965. Т. 44, №1. С. 101 – 109.

Окулова Н.М., *Юничева Ю.В.*, *Баскевич М.И.*, *Рябова Т.Е.*, *Агиров А.Х.*, *Балакирев А.Е.*, *Василенко Л.Е.*, *Потапов С.Г.* Видовое разнообразие, размещение и численность мелких

млекопитающих южных территорий Краснодарского края и республики Адыгея // Млекопитающие горных территорий: Материалы Междунар. конф. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2005. С. 122 – 130.

Орлов В.Н., *Балакирев А.Е.*, *Борисов Ю.М.* Новый подвид кавказской бурозубки *Sorex satunini* (Mammalia) и филогенетические связи вида по мтДНК последовательностям и хромосомным маркерам // Поволж. экол. журн. 2010. № 1. С. 111 – 114.

Осипова В.А. История формирования фауны землероек (сем. Soricidae) Кавказа: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2006. 22 с.

Соколов В.Е., *Темботов А.К.* Млекопитающие Кавказа: Насекомоядные. М.: Наука, 1989. 548 с.

Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24 – 8 тыс. л. н.). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. 556 с.

Balakirev A.E., *Illarionova N.A.*, *Potapov S.G.*, *Orlov V.N.* DNA polymorphism within *Sorex araneus* from European Russia as inferred from mt DNA cytochrome *b* sequences // Rus. J. Theriology. 2007. Vol. 6, № 1. P. 35 – 42.

Bulatova N., *Searle J.B.*, *Bystrakova N.*, *Nadjafova R.S.*, *Shchipanov N.*, *Orlov V.* The diversity of chromosome races in *Sorex araneus* from European Russia // Acta Theriologica. 2000. Vol. 45. Suppl. 1. P. 33 – 46.

Bystrakova N., *Bulatova N.*, *Koval'skaya Y.*, *Shchipanov N.*, *Kalinin A.*, *Nadjafova R.*, *Searle J.B.* Geographical limits of chromosome races of common shrew *Sorex araneus* L. in the Middle Volga (East European Russia) // Mammalia. 2003. Vol. 68. P. 187 – 192.

Markova A.K., *Smirnov N.G.*, *Kozharinov A.V.*, *Kazantseva N.E.*, *Simakova A.N.*, *Kitaev L.M.* Late Pleistocene distribution and diversity of mammals in Northern Eurasia // Paleontologia i Evolucio. 1995. Vol. 28 – 29. P. 1 – 115.