

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/277712607>

Григорьева и др. 2015 Генетика (Sorex araneus) GENo711

Data · June 2015

CITATIONS

0

READS

87

6 authors, including:



Olga Grigoryeva

Severtsov Institute of Ecology and Evolution

28 PUBLICATIONS 56 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Valeriy Vladimirovich Stakheev

Russian Academy of Sciences

36 PUBLICATIONS 36 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Alexander E Balakirev

Russian Academy of Sciences

61 PUBLICATIONS 277 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Small mammals of Caucasus, new incites in taxonomy and biodiversity [View project](#)



Атлас распространения млекопитающих России // Atlas of Russian mammals distribution [View project](#)

УДК 575.8:57.06:577.2:597/599

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ОБЫКНОВЕННОЙ БУРОЗУБКИ *Sorex araneus* L. 1758 (Mammalia, Lipotyphla) НА СПЛОШНЫХ И ФРАГМЕНТИРОВАННЫХ УЧАСТКАХ АРЕАЛА

© 2015 г. О. О. Григорьева¹, Ю. М. Борисов¹, В. В. Стахеев²,
А. Е. Балакирев¹, Д. М. Кривоногов³, В. Н. Орлов¹

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва 119071
e-mail: grig_forever@mail.ru

²Институт аридных зон Южного научного центра Российской академии наук, Ростов-на-Дону 344006

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (Арзамасский филиал), Арзамас 607220

Поступила в редакцию 14.07.2014 г.

В настоящей работе генетическая изменчивость популяций обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. Восточной Европы изучена на основе секвенирования митохондриального гена *сyt b*. Проанализированы 82 последовательности митохондриального гена *сyt b* длиной 953 пн, в том числе пяти хромосомных рас на сплошном ареале вида в лесной зоне и двух рас из фрагментированной части ареала в степной зоне. На сплошном ареале обыкновенной бурозубки филогеографическая подразделенность не выражена, не было выявлено также достоверной корреляции между генетическими и географическими дистанциями. Мы не получили убедительных доказательств влияния узких гибридных зон между хромосомными расами на поток нейтральных аллелей. Значительная *p*-дистанция ($0.69 \pm 0.27\%$) географически близких популяций хромосомной расы Нерусса указывает на формирование кариотипа этой расы в плиоцене или плейстоцене. В нашей работе филогеографическая структура определялась скорее фрагментированностью ареала вида, нежели его кариотипическими особенностями.

DOI: 10.7868/S0016675815030042

Обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus* L. — эвритопный вид лесных и луговых экосистем. Этот вид широко распространен не только в лесной, но также в лесостепной и степной зонах Европы. Подобно другим мезофильным видам ареал обыкновенной бурозубки фрагментирован в степной зоне, поскольку пригодные для обитания биотопы (лесные острова, поймы рек и озер) в различной степени изолированы сухими степными ландшафтами. В лесной зоне Европы биотопическая изоляция популяций этого вида редка и даже крупные реки не служат препятствием для расселения бурозубок [1].

Но отдельные небольшие популяции могут быть частично изолированы урбанизированными территориями или сухими песчаными биотопами на месте вырубленных лесов.

Естественная фрагментированность лесов служит эволюционным фактором изоляции популяций лесных видов позвоночных и беспозвоночных животных. При этом виды, населяющие природные фрагментированные ландшафты, оказываются более приспособленными к обитанию в таких условиях, в частности к инбридингу, по сравнению с популяциями недавно фрагментированных местообитаний [2].

Влияние вырубки лесов на генетическую изменчивость популяций изучалось преимущественно на беспозвоночных [2] и крайне мало известно о влиянии фактора изоляции на генетическую изменчивость биотопически изолированных популяций млекопитающих.

До настоящего времени фрагментированность ареала обыкновенной бурозубки не учитывали в исследованиях изменчивости мтДНК генов. Исследователей прежде всего интересовала молекулярная изменчивость в связи с уникальным кариотипическим разнообразием вида. К настоящему времени у обыкновенной бурозубки описано более 70 хромосомных рас, больших географических популяций, которые отличаются различными (от 2 до 5) робертсоновскими транслокациями (Rb) хромосом [3–5]. Поэтому гибридные зоны между хромосомными расами теоретически могут влиять на поток генов.

В настоящей работе мы рассматриваем нуклеотидную и гаплотипическую изменчивость гена *сyt b* обыкновенной бурозубки в выборках на сплошном ареале вида в лесной зоне, в том числе частично изолированной биотопически популяции расы Кириллов и контактирующих популяций четырех хромосомных рас на Валдайской возвышенности (Москва, Западная Двина, Сели-

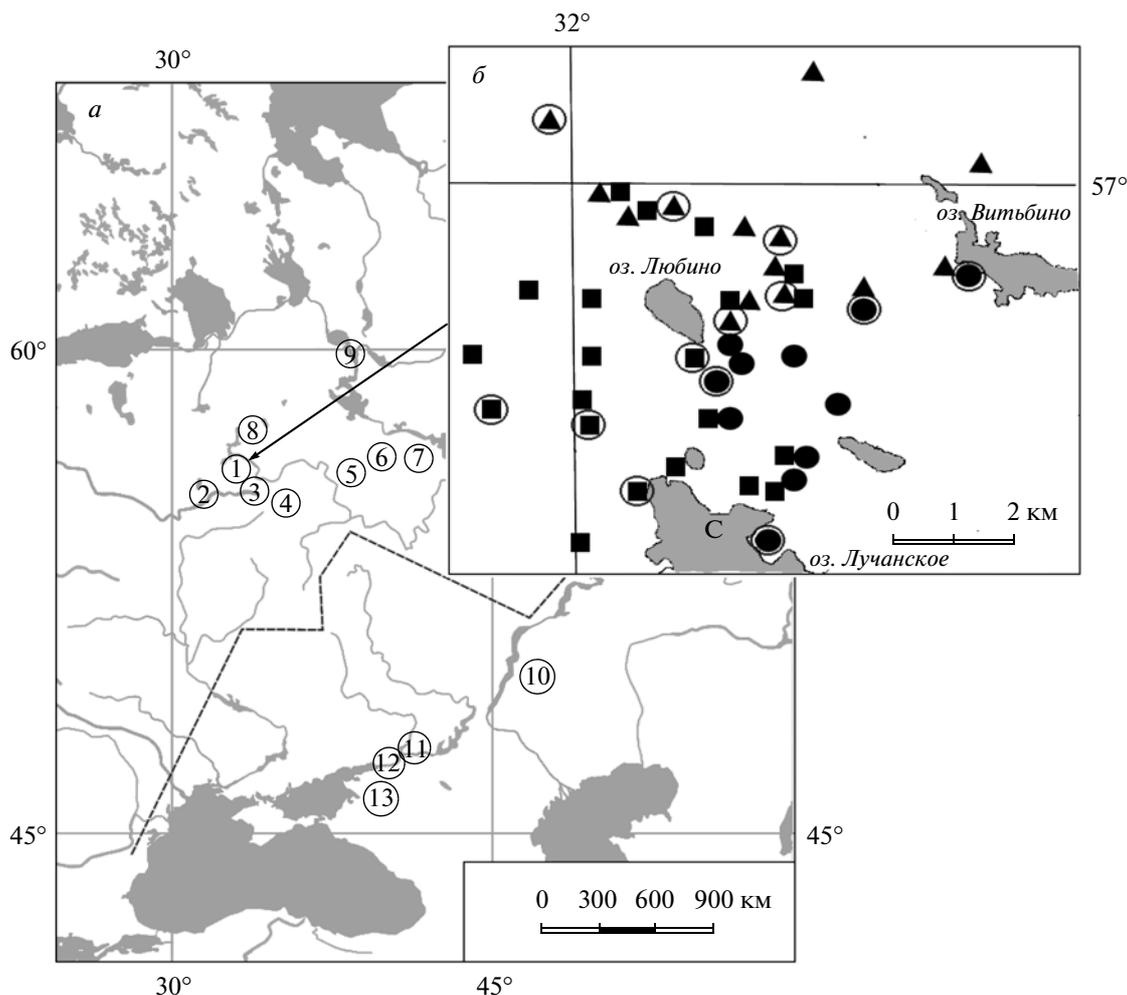


Рис. 1. Места сбора образцов обыкновенной бурозубки (а). Пунктиром показана южная граница лесной зоны в Восточной Европе (южная граница сплошного ареала обыкновенной бурозубки). Номера локалитетов указаны в табл. 1. б – места находок бурозубок в зоне контакта трех хромосомных рас: ● – раса Москва, ■ – раса Западная Двина, ▲ – раса Селигер. Обведены пункты взятия молекулярных проб.

гер и С.-Петербург), а также частично изолированных популяций рас Сок и Нерусса в степной зоне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Материалом настоящего исследования послужили образцы тканей 82 обыкновенных бурозубок семи хромосомных рас. Образцы были генотипированы по гену *сут b*, все вновь полученные последовательности этого гена депонированы в базу ГенБанка. Список образцов, шифры проб в генетическом анализе и их номера в ГенБанке приведены в табл. 1, локалитеты показаны на рис. 1.

Выборки пяти рас (Москва, Селигер, Западная Двина, С.-Петербург и Кириллов) взяты в области сплошного ареала вида в зоне широколиственных-хвойных лесов Валдайской возвышенности и

Верхней Волги. Выборки рас Москва, Селигер и Западная Двина на Валдайской возвышенности взяты в районе контакта и гибридизации этих трех рас [6] (рис. 1). Бурозубки расы Кириллов отловлены в заболоченной протоке, соединяющей озера Долгое и Сиверское и окруженной урбанизированными территориями и каменистыми пустошами на месте вырубленных сосновых лесов (г. Кириллов Вологодской области).

Выборки двух других рас, Сок и Нерусса, взяты из частично изолированных популяций в зоне степей. Бурозубки расы Сок отловлены в изолированном лесном массиве “Дьяковский лес” по р. Еруслан, левому притоку Волги, в подзоне сухих степей Саратовской области. Бурозубки расы Нерусса отловлены в двух популяциях в подзоне разнотравных степей по нижнему течению Дона, в том числе на заболоченном острове в дельте Дона напротив пос. Кагальник и в 50 км восточнее,

Таблица 1. Характеристика исследованного материала

Раса	Локалитет (номер по рис. 1)	Код образца (№ в ГенБанке)
Западная Двина	Любино (зона контакта трех рас), Тверская обл., 56°51' N, 32°02' E (1)	Wd158, Wd45, Wd52, Wd53, Wd84 (KC311237–KC311241), Wd12, Wd13, Wd49 (JN984059–JN984061)
	Великие Луки, Псковская область, 56°18' N, 30°30' E (2)	Wd96, Wd98, Wd100, Wd103, Wd105, Wd107, Wd109, Wd110, Wd111, Wd112 (JN984063–JN984072)
Селигер	Любино (зона контакта трех рас), Тверская обл., 56°51' N, 32°02' E (1)	SI23, SI27, SI42, SI100, SI116, SI135, SI136, SI143, SI144, SI198 (JN984079–JN984088), SI214 (KC311236)
	Любино (зона контакта трех рас), Тверская обл., 56°51' N, 32°02' E (1)	Mo39 (JN984089), Mo102, Mo131, Mo97 (KC311228–KC311230), Mo96, Mo103, Mo115, Mo121 (JN984091–JN984094)
Москва	Нелидово, Тверская обл., 56°26'54" N, 33°02'02" E (3)	MoCLZ57 (KC311242), MoCLZ58 (KC311243)
	Малинки, Московская обл., 55°27'22" N, 37°09'30" E (4)	MoM2 (JN984095), MoM4 (JN984096)
	Владимирская обл., 56°20' N, 41°25' E (5)	MoVL37 (KC311231), MoVL38 (KC311232)
	Иваново, Ивановская обл., 56°60' N, 40°59' E (6)	MoIv2, MoIv3, MoIv4 (JN984097–JN984099)
	Плес, Ивановская обл., 57°27' N, 41°30' E (7)	MoPI1 (JN984100), MoPI2 (JN984101)
Санкт-Петербург	Валдай, Новгородская обл., 55°57'10" N, 33°17'50" E (8)	SP3, SP4, SP5 (KC311244–KC311246), SP7, SP11, SP16, SP18 (JN984110–JN984113), SP479, SP486, SP490 (KC311248–KC311250)
Кириллов	Кириллов, Вологодская обл., 59°51'30" N, 38°22'02" E (9)	Kr121, Kr123, Kr125, Kr127, Kr129, Kr131, Kr133, Kr137 (JN984102–JN984109)
Сок	Дьяковка, Саратовская обл., 50°44'42" N, 46°46'23" E (10)	So2, So4, So8, So10, So12, So18 (JN984073–JN984078)
Нерусса	Большой Лог, Ростовская обл., 47°17'04" N, 39°54'47" E (11)	Ne223, Ne230, Ne231 (KC311233–KC311235)
	Кагальник, Ростовская обл., 47°04'49" N, 39°18'08" E (12)	Ne173–Ne175, Ne201–Ne203 (JN984114–JN984119)
<i>S. satunini tembotovi</i>	Первомайское, Краснодарский край, 45°39'56" N, 39°40'46" E (13)	S.sat40 JN984120

в луговой долине р. Аксай правого притока Дона, пос. Большой Лог (табл. 1, рис. 1). Образцы собраны в 2007–2012 гг. Во всех случаях принадлежность бурозубок к определенной расе была подтверждена исследованием кариотипа особей. В качестве внешней группы взят гаплотип кавказской бурозубки Темботова, *S. satunini tembotovi* Orlov, Balakirev, Borisov, 2010 (табл. 1).

Выделение ДНК и амплификация. Для анализа мтДНК использованы образцы печени, фиксированные в 96%-ном этаноле. Тотальную ДНК выделяли по стандартной методике путем лизиса ткани печени протеиназой К в присутствии SDS (додецилсульфат натрия, sodium dodecyl sulfate) с последующей депротеинизацией смесью фенол-хлороформ и осаждением ДНК.

Фрагмент гена *сyt b* амплифицировали с праймерами L14734 [7] и H15985 [8]. Амплификационная смесь объемом 25 мкл содержала 60 мМ трис-HCl (рН 7.5), 10 мМ сульфата аммония, 0.1% твин-20, по 100 мкМ каждого dNTP, 2 мМ MgCl₂, по 0.1 мМ праймеров, 1 ед. *Taq*-полимеразы и 25–100 нг тотальной ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях: один цикл первоначальной денатурации при 94°C (3 мин), 35 циклов с денатурацией при 94°C (30 с), отжиг праймеров при 50°C (30 с), достройка цепи при 72°C (1 мин) и один заключительный цикл при 72°C (10 мин).

Очищенную ДНК секвенировали в обоих направлениях на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant с праймерами L395st и H589st [9]. Полученные последовательности ДНК депонированы в ГенБанке под номерами JN984059–JN984061, JN984063–JN984089, JN984091–JN984120, KC311228–KC311250 (табл. 1). Длина анализируемых последовательностей составила 953 нуклеотида.

Оценка генетического разнообразия. Первичную обработку с целью исправления ошибок секвенатора и выравнивания нуклеотидных последовательностей мтДНК проводили с использованием программного обеспечения CHROMAS v. 2.01 (Technelysium Pty Ltd.), SEQMAN v. 4.05, EDITSEQ v. 4.05 (DNASStar, Lasergene), BIOEDIT v. 7.0.9.0 [10] и MEGA v. 5.2 [11]. Значения гаплотипического (h) и нуклеотидного разнообразия (π), количества гаплотипов были оценены согласно статистике Нея [12] с использованием программы ARLEQUIN v. 3.5 [13].

Для проведения статистических вычислений выборки составлялись на основании расовой принадлежности. Генетические дистанции (K2P) внутри и между выборками были рассчитаны с использованием программного обеспечения MEGA. Статистическая значимость результатов была оценена методом бутстрепа (1000 реплик). Генетическая структура выборок выявлялась с ис-

пользованием анализа AMOVA, проведенного в программе ARLEQUIN.

Тесты на селективную нейтральность и экспансию. Одним из наиболее простых методов оценки существования отбора, направленного на закрепление новых вариантов аминокислотной последовательности, является оценка отношения скорости возникновения мутаций, приводящих к аминокислотным заменам (несинонимические мутации, N_a), к скорости возникновения молчащих (синонимических) мутаций (N_s). Отношение N_a/N_s , меньшее или равное единице, свидетельствует о нейтральной селекции, поддерживающей консервативность аминокислотной последовательности; отношение больше единицы говорит в пользу существования положительного отбора новых аминокислотных вариантов [14].

На следующем этапе мы оценили возможности селективного отбора отдельных аллелей внутри выборок. Для проведения этой оценки были использованы тесты Таджимы (Tajima's D test of selective neutrality) и Фу (Fu's F_s test of selective neutrality), включенные в пакет программного обеспечения ARLEQUIN. Статистическая значимость результатов была вычислена при 1000 реплик. Положительные значения параметров свидетельствуют о балансирующем отборе, эффекте "бутылочного горлышка" или о структурированности популяции, отрицательные – об отрицательном, положительном отборе, а также экспансии популяции.

Для выявления экспансии были построены гистограммы распределения парных различий (mismatch distributions) с использованием ARLEQUIN. Гладкая колоколообразная кривая говорит о пространственном расширении популяции, в то время как мультимодальная кривая свидетельствует о долгой эволюционной истории [15]. Для выявления статистической значимости использовали параметр суммы квадратов отклонений (SSD) между наблюдаемыми и ожидаемыми распределениями различий при экспансии с применением параметрического метода бутстрепа (1000 реплик). Мы также использовали статистику Реймоса R_2 , которая основана на разнице между числом единичных замен (синглтонов) в последовательности и средним количеством нуклеотидных различий. Статистическую значимость вычисляли путем 1000 коалесцентных симуляций в программе DNASP v. 5.0. Низкие значения R_2 наблюдаются при процессах роста популяции [16].

Изоляция расстоянием. Корреляция между генетическими и географическими дистанциями изучаемых выборок (табл. 1) оценивалась тестом Мантела [17]. Локалитеты разных хромосомных рас из пункта Любино были объединены в один, таким образом в анализе приняли участие 12 выборок. Достоверность результатов оценивалась

путем проведения 1000 перемешиваний строк и столбцов матрицы. Анализ выполнен с использованием программы GENALEX v. 6.5 [18].

Филогенетический анализ проводили на основании методов присоединения соседей (neighbor-joining, NJ), максимальной экономии (maximum parsimony, MP) и максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). В качестве внешней группы использован образец *S. tembotovi* (табл. 1).

Филогенетические дистанции вычислялись методом NJ на основании 2-параметрического алгоритма Кимуры со значением индекса бутстрепа в 1000 реплик. MP-анализ включал эвристический метод деления-воссоединения (TBR, tree bisection and reconnection) при замене ветвей (10000 случайно добавленных сиквенсов) и проводился со значением индекса бутстрепа в 1000 реплик (при обоих видах анализа использовалась программа MEGA).

ML анализ проводили с помощью программы PHYLML v. 3.0 [19] (индекс бутстрепа составил 1000 реплик) после определения соответствующей модели нуклеотидных замен, выбранной на основании байесовского критерия (BIC), используя JModelTest v. 2.1.1 [20]. Наиболее оптимальной оказалась эволюционная модель HKY + I, в которой процент инвариабельных сайтов составил 77.4% ($p\text{-inv} = 0.7740$). Наиболее редким нуклеотидом оказался гуанин ($\pi_G = 0.14$), остальные нуклеотиды встречались с примерно равной частотой ($\pi_A = 0.28$, $\pi_C = 0.29$, $\pi_T = 0.28$).

Для визуализации использовали программу FIGTREE v. 1.4.0 [21]. Топология ML-дерева в целом соответствовала топологиям MP- и NJ-деревьев, поэтому в работе представлено одно дерево.

Медианная сеть гаплотипов цитохрома *b* была построена с помощью программного обеспечения NETWORK v. 4.6.0.0 [22] при значении $\epsilon = 10$, а также с использованием опции максимальной экономии Стейнера, позволяющей минимизировать количество медианных векторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическое разнообразие

В полученных последовательностях гена *cut b* было обнаружено 64 (6.7%) вариабельных позиции. Большинство замен были синонимичными (58; 90.6%) и являлись транзициями (61; 95.3%). Отмечен дефицит гуанина (13.68%) при сбалансированности остальных нуклеотидов (29.01% тимина, 29.12% цитозина, 28.19% аденозина). Эту особенность гена *cut b* различных видов бурозубок рода *Sorex* отмечали неоднократно [23–27].

На сплошном ареале вида в лесной зоне гаплотипическое разнообразие выборок находилось в пределах от 0.64 до 0.98, нуклеотидное разнообразие — в пределах 1.31–3.17. На фрагментирован-

ных частях ареала гаплотипическое разнообразие составляло 0–0.73, нуклеотидное 0–2.31 (табл. 2). Самый низкий уровень генетического разнообразия наблюдался в выборках частично изолированных популяций, самый высокий — в выборках на сплошном ареале вида (за исключением изолированной выборки Кириллов) (табл. 2).

Средний показатель генетических дистанций между всеми выборками составил $0.42 \pm 0.06\%$. Анализ AMOVA показал, что большая часть генетического разнообразия мтДНК была распределена внутри выборок (75%).

Тесты на селективную нейтральность и экспансию

Мы вычислили величину N_a/N_s для наблюдаемых замен в последовательности фрагмента гена *cut b* и получили значения меньше единицы для всех выборок (табл. 2). Таким образом, анализ выявленных мутаций указывает на то, что ген *cut b* находится под действием нейтрального отбора.

Значения показателей тестов Таджимы для популяций на сплошном ареале вида были отрицательными (табл. 2), что свидетельствует о высоком числе редких замен по сравнению с ожидаемым в рамках нейтральной модели эволюции и предполагает недавнюю экспансию (расширение ареала популяций). Значения показателя теста Фу были также достоверно отрицательными для выборок хромосомных рас Валдайской возвышенности (табл. 2), что показывает высокое число редких гаплотипов по сравнению с ожидаемым при нейтральной модели эволюции и также предполагает недавнюю экспансию [15]. Отрицательные значения показателей тестов Таджимы и Фу могут свидетельствовать о наличии направленного отбора. Однако это не подтверждается результатами теста Реймоса (R_2). Значения R_2 были достоверно малы для выборок Валдайской возвышенности, предполагая экспансию (табл. 2). Гистограмма распределения парных различий в объединенной выборке четырех рас на Валдайской возвышенности представляет собой гладкую колоколообразную кривую ($SSD = 0.001$, $P = NS$, недостоверное значение показателя), что может быть связано с недавним расширением ареала популяций (рис. 2) [15].

Результаты тестов для выборок из частично изолированных популяций Кириллов и Сок показывают отсутствие экспансии (расширение ареала) и говорят о прохождении “бутылочного горлышка”, что подтверждается низким нуклеотидным разнообразием (табл. 2). Однако статистического подтверждения этому мы не получили, что может быть результатом малых выборок. Относительно тестов экспансии (расширения ареала популяций) следует упомянуть, что тест

Таблица 2. Гаплогипическое (h) и нуклеотидное (π) разнообразие гена сур b , оценки тестов селективной нейтральности и экспансии

Выборки хромосомных рас	N	Nh	$h \pm \text{C. O.}$	$\pi \times 10^3 \pm \text{C. O.}$	Tajima's D	N_d/N_s	F_u 's F_s	R_2	SE SSD
Выборки на сплошном ареале вида									
Западная Двина	18	12	0.915 \pm 0.052	3.17 \pm 1.94	-2.163**	0.095	-5.921***	0.143***	0.008 NS
Москва	19	16	0.977 \pm 0.027	3.93 \pm 2.32	-1.867*	0.136	-11.595***	0.139***	0.001 NS
Селигер	11	8	0.927 \pm 0.067	2.79 \pm 1.81	-1.759*	0.083	-3.414**	0.173***	0.080***
Санкт-Петербург	11	9	0.964 \pm 0.051	4.24 \pm 2.59	-0.685 NS	0.077	-3.512*	0.166*	0.024 NS
Кириллов	8	4	0.643 \pm 0.184	1.31 \pm 1.05	-1.595*	0	-0.785 NS	0.229 NS	0.032 NS
Выборки из фрагментированных частей ареала									
Сок	6	3	0.600 \pm 0.215	2.31 \pm 1.71	-0.932 NS	0.200	1.199 NS	0.245 NS	0.116 NS
Нерусса	9	4	0.806 \pm 0.089	3.79 \pm 2.40	1.029 NS	0.143	1.743 NS	0.182 NS	0.092 NS
Катальник	6	3	0.733 \pm 0.155	0.91 \pm 0.85	-0.050 NS	0	-0.427 NS	0.279***	0.064 NS
Б. Лог	3	1	0	0	0 NS	-	-	-	0

Примечание. Стандартные ошибки (C.O.) рассчитаны, где это было возможно, после 1000 бутстреп-реплик. SE SSD – суммы квадратов отклонений при анализе распределения парных различий пространственной (spatial expansion) структур.

* $p < 0.5$.** $p < 0.01$.*** $p < 0.001$.

Таджимы обладает меньшей статистической эффективностью, чем тесты Фу и Реймоса.

Мы отметили положительные значения параметров тестов Таджимы и Фу при анализе выборки расы Нерусса. Такой результат может быть обусловлен структурированностью этой выборки. Действительно, при разделении общей выборки на две, согласно географической принадлежности, мы выявили наличие экспансии для выборки “Кагальник” (табл. 2, гистограммы распределения парных различий представляют собой гладкие колоколообразные кривые). Анализ второй выборки был невозможен ввиду ее немногочисленности.

Изоляция расстоянием

Тест Мантела выявил корреляцию между генетическими и географическими дистанциями при анализе всех выборок (коэффициент корреляции $R = 0.647$, $P = 0.001$). После исключения из анализа двух выборок расы Нерусса результаты теста показали отсутствие корреляции ($R = 0.335$, $P = 0.125$). Таким образом, вклад в корреляцию вносят только выборки фрагментированных участков ареала, при этом отсутствует корреляция между генетическими и географическими дистанциями выборок из области сплошного ареала вида ($R = 0.110$, $P = 0.123$).

Филогенетический анализ

В общей выборке особей ($N = 82$) найден 51 гаплотип, из них 41 гаплотип уникален, остальные отмечены у двух и более особей (рис. 3, 4). Медианная сеть филогенетических отношений между гаплотипами гена *сyt b* отражает “звездообразную” филогению (рис. 3). Наиболее часто встречающийся гаплотип (обозначен как “центральный”) обнаружен у 17 особей всех пяти хромосомных рас на сплошном ареале вида (25% от общего количества исследованных особей). При этом особенно велика доля этого гаплотипа в частично изолированной популяции расы Кириллов (62.5%).

Следует отметить, что центральный гаплотип не обнаружен в выборках из фрагментированной части ареала вида, в расах Сок и Нерусса. На 4–5 замен от центрального гаплотипа отстоят отдельные гаплотипы кариотипических рас Москва и С.-Петербург и на 5–6 замен – гаплотипы выборок хромосомной расы Нерусса (рис. 3, 4) по нижнему течению Дона (Кагальник и Б. Лог). Географическое расстояние между этими выборками не превышает 50 км, но p -дистанции между ними ($0.69 \pm 0.27\%$) близки к дистанциям между выборками расы Нерусса и остальными исследованными выборками ($0.66 \pm 0.19\%$), что также указывает на значительный уровень дивергенции

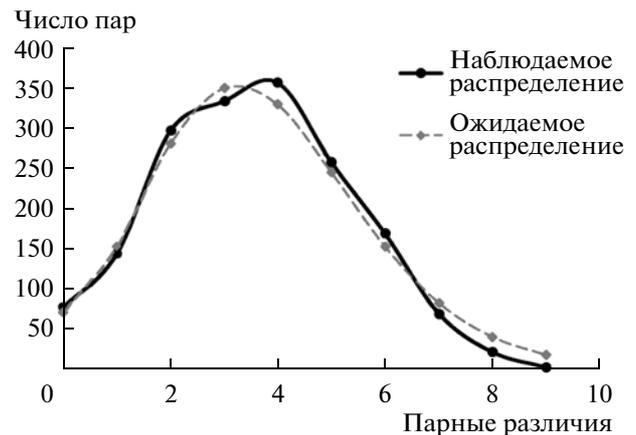


Рис. 2. Гистограмма распределения парных различий (mismatch distribution) для объединенной выборки хромосомных рас Западной Двина, Москва, Селигер и С.-Петербурга. SSD = 0.001, NS.

этих популяций (табл. 3). Вероятно, при исследовании большего материала в расе Нерусса можно будет выделить несколько гаплогрупп.

Исследованная нами группа гаплотипов расы Сок из лесного изолята в Саратовской области (рис. 1) удалена от центрального гаплотипа на 3 нуклеотидные замены и характеризуется средним гаплотипическим и низким нуклеотидным разнообразием (табл. 2). Для этой популяции характерен свой чаще встречающийся гаплотип (рис. 3, 4), выявленный у пяти особей данной популяции. Средний уровень поддержки бутстрепа (48–60%, рис. 4) не позволяет нам выделить этот лесной изолят в отдельную гаплогруппу, и только для удобства описания мы обозначаем эту группу гаплотипов как “Дьяковка” (рис. 3, 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая структура популяций на сплошном ареале вида

Хромосомные расы Валдайской возвышенности (Москва, Селигер, Западная Двина и С.-Петербург) и раса Кириллов характеризуются сплошным расселением на огромной территории от Финского залива на севере до верховий Днепра и Оки на юге и от оз. Ильмень на западе до р. Мезень на востоке [28, 29].

На сплошном ареале обыкновенной бурозубки в лесной зоне Восточной Европы филогеографическая подразделенность не выражена. Анализ исследованных выборок показал высокое гаплотипическое разнообразие при относительно низком нуклеотидном, что также отмечалось в различных исследованиях мтДНК обыкновенной бурозубки [24–27]. Исключение составляет частично изолированная популяция расы Кирил-

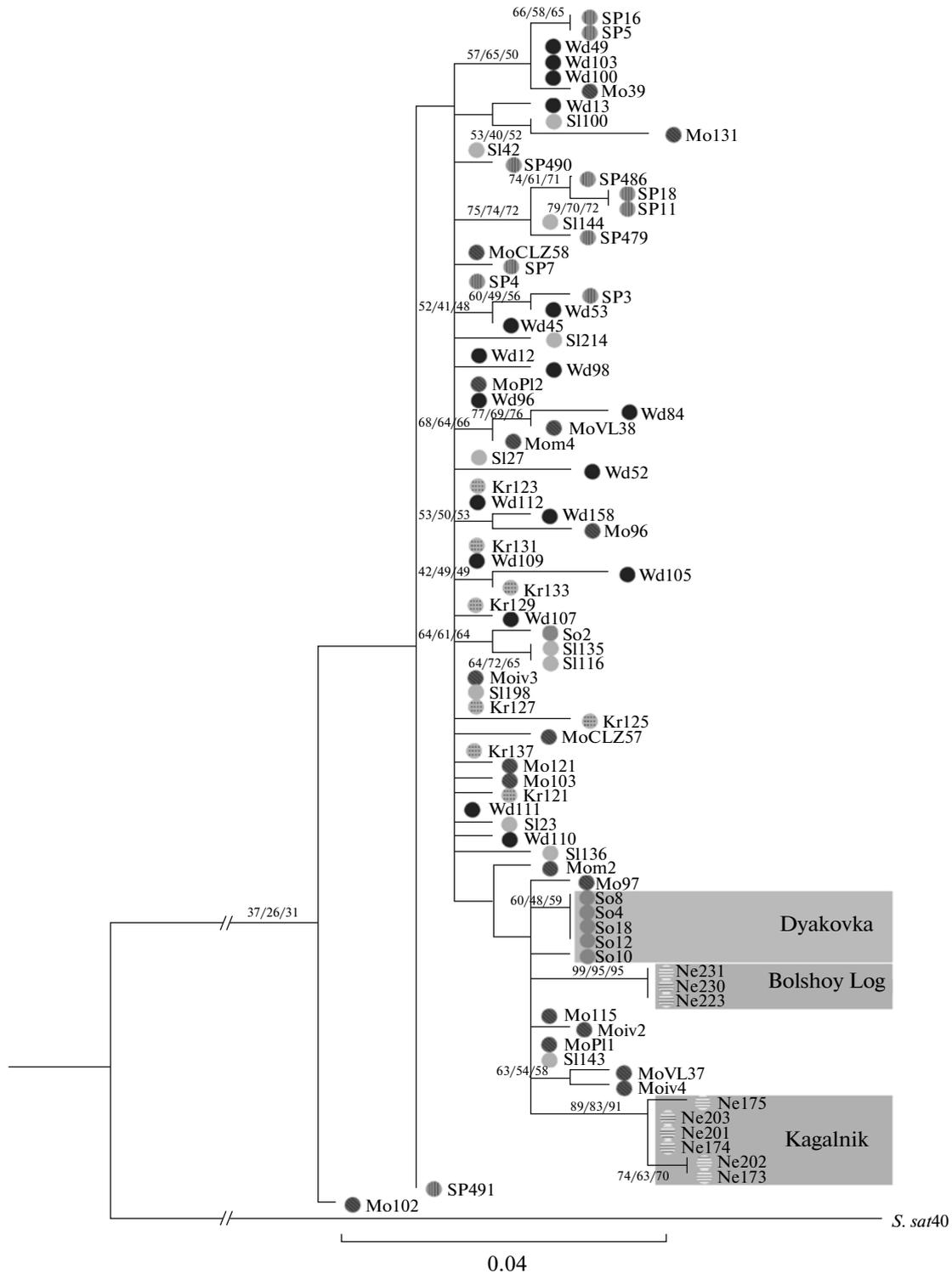


Рис. 4. Филогенетические отношения *S. araneus* по результатам анализа гена *cyt b* (953 пн). Топология и длины ветвей соответствуют ML-дереву, в узлах которого приведены индексы бутстрепа (1000 реплик для каждого анализа, показаны значения ≥ 20) по методам максимального правдоподобия (ML), присоединения соседей (NJ), максимальной энтропии (MP) и в последовательности ML/MP/NJ. Обозначения – как на рис. 3.

По нашим данным, экспансия (расширение ареала популяций) характерна именно для выборок на сплошном ареале вида. Данный вывод

поддерживается результатами анализа распределения парных различий в объединенной выборке рас Валдайской возвышенности. Наблюдаемая

картина может быть связана с быстрым расширением ареалов хромосомных рас при переходе от плейстоцена к голоцену. Исключение составляет биотопически изолированная выборка хромосомной расы Кириллов. Низкое генетическое разнообразие этой выборки и отсутствие достоверности тестов на экспансию свидетельствуют о ее частичной изоляции урбанизированной территорией и сухими песчано-каменистыми биотопами на месте вырубленных сосновых лесов. Сосново-березовые леса в окрестностях оз. Великое, откуда взята выборка расы Кириллов, известны с начала голоцена, 10 тыс. лет назад [32], но их вырубка усилилась с XIX века.

Промышленная заготовка древесины в последние два столетия резко сократила площади нетронутых лесных ландшафтов и увеличила фрагментированность лесной зоны и ареалов лесных видов. В европейской части России площадь нетронутых лесных ландшафтов составляет в настоящее время всего 9% лесной зоны [33]. Кроме того, огромны экологические различия между природными и эксплуатируемыми лесами, состоящими из монокультурных посадок одного возраста. В популяциях фрагментированных ландшафтов снижается генетическая изменчивость из-за уменьшения эффективного размера популяций.

Генетические различия популяций в области контакта хромосомных рас

Молекулярные исследования с использованием микросателлитов показали, что у обыкновенной бурозубки поток генов через акроцентрические хромосомы и перестроенные робертсоновскими соединениями хромосомы не отличается во всех изученных до сих пор межрасовых гибридных зонах [34, 35]. Следовательно, робертсоновские соединения хромосом у обыкновенной бурозубки не создают эффекта изоляции.

Тем не менее можно было ожидать, что будут найдены различия гена *cut b* хромосомных рас, контактирующих на Валдайской возвышенности. Во-первых, несомненна длительная изоляция этих рас на протяжении всего последнего Валдайского ледникового [36]. Во-вторых, в выборках из гибридных зон с гибридами-комплексными гетерозиготами наблюдаемая численность гибридов-сеголеток составляет около половины ожидаемой при случайном скрещивании. Между хромосомными расами отмечается поведенческая изоляция, ассортативное скрещивание, которое может повлиять на поток генов [37].

Мы не получили убедительных доказательств влияния узких гибридных зон на поток нейтральных аллелей и не обнаружили гаплотипов *cut b*, способных диагностировать хромосомные расы.

Не удалось обнаружить достоверных различий между хромосомными расами в Западной и Центральной Европе [24–26, 30, 38, 39] и на северо-востоке Европы [27].

Можно отметить, что наибольшая часть генетического разнообразия мтДНК была распределена внутри выборок (по результатам теста AMOVA), не было обнаружено достоверной корреляции между генетическими и географическими дистанциями в популяциях на сплошном ареале вида, вклад в корреляцию вносили только самые отдаленные выборки фрагментированной части ареала. В предыдущих работах по микросателлитам мы также подчеркивали, что генетическое дифференцирование внутри рас превышало таковое между расами, при этом не было выявлено достоверной корреляции между генетическими и географическими дистанциями [34]. Сходные данные отмечались во многих работах [24, 27, 38, 40].

Генетическая структура популяций на фрагментированных участках ареала

На протяжении голоцена формировалась естественная фрагментированность ареалов основных лесообразующих пород в тех регионах Европы, где годовая сумма осадков была меньше 400 мм. Соответственно, фрагментированы и современные ареалы лесных видов, а виды, общие для Русской равнины и Северного Кавказа, имеют разрывы ареалов в степной зоне между Нижним Доном и Кубанью.

Пониженное генетическое разнообразие частично изолированной популяции “Дьяковка” хромосомной расы Сок в области сухих степей связано с длительным сохранением низкой численности. Можно предположить, что данная популяция прошла через стадию “бутылочного горлышка” (что косвенно подтверждается результатами тестов на нейтральность и экспансию, см. выше). Заметно также, что особенности изменчивости этой популяции по микросателлитным локусам [41] и последовательностям *cut b* гена значительно отличаются. Отмеченные различия могут быть следствием меньшей скорости накопления мутаций гена *cut b* по сравнению с микросателлитными локусами. Очевидно за время после прохождения популяцией стадии резкого падения численности или эффекта основания популяции небольшим числом особей гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие гена *cut b* изменилось мало и осталось низким. Напротив, изменчивость микросателлитных локусов за это время восстановилась и сравнивалась с уровнем изменчивости других популяций.

Лесная растительность по левобережью Волги, в том числе и Дьяковский лес, известна не менее 8 тыс. лет [42]. Южные островные леса Заволжья никогда не входили в зону сплошных лесов. Их

Таблица 3. Оценка уровня дивергенции на основании K2P-дистанций ($\times 10^2$) по данным мтДНК (ниже диагонали) и их стандартные отклонения (выше диагонали)

	Wd	Mo	Sl	Kr	So	Sp	Ne		<i>S. sat</i>
							Kag	BLog	
Wd	—	0.07	0.05	0.05	0.13	0.09	0.23	0.23	0.89
Mo	0.38	—	0.07	0.06	0.11	0.09	0.20	0.21	0.85
Sl	0.31	0.35	—	0.05	0.13	0.09	0.23	0.22	0.85
Kr	0.23	0.29	0.21	—	0.13	0.08	0.23	0.22	0.85
So	0.46	0.40	0.39	0.36	—	0.15	0.18	0.20	0.85
Sp	0.39	0.46	0.38	0.32	0.54	—	0.24	0.23	0.86
Kag	0.74	0.66	0.69	0.62	0.53	0.83	—	0.27	0.83
BLog	0.69	0.60	0.63	0.59	0.48	0.78	0.69	—	0.83
<i>S. sat</i>	5.64	5.58	5.63	5.58	5.67	5.77	5.53	5.53	—

изоляция усилилась, когда 2000 лет назад в субатлантический период они оказались в зоне сухих степей. Именно в это время, вероятнее всего, произошло резкое уменьшение генетической изменчивости, которое прослеживается в настоящее время по изменчивости гена *cyt b*.

В бассейне Нижнего Дона местообитания обыкновенной бурозубки ограничены частично изолированными мезофильными участками. Результаты тестов Таджимы и Фу, оценки уровня дивергенции и анализа филогенетической структуры указывают на значительный уровень дивергенции двух популяций хромосомной расы Нерусса (табл. 2, 3; рис. 3, 4).

Среди цитогенетиков преобладает общее мнение о формировании хромосомных рас обыкновенной бурозубки в послеледниковье [35]. Обнаруженная значительная дивергенция гаплотипов в пределах хромосомной расы Нерусса указывает на формирование ее кариотипа в плейстоцене, а не в голоцене. Хромосомная раса Нерусса, вероятнее всего, имеет гибридное происхождение и возникла в процессе гибридизации расы Москва и аборигенной хромосомной расы с восточноевропейскими метacentриками *go*, *mn* с последующей фиксацией хромосомных перестроек в ледниковых рефугиумах [43]. В пределах современного ареала расы Нерусса обыкновенная бурозубка впервые отмечена в теплое Микулинское межледниковье, 150–100 тыс. лет назад [44].

Если гибридизация произошла в это время, то последующая фиксация заимствованных метacentриков вероятна в малых рефугиумах последнего ледниковья, которое эта раса могла пережить в нескольких рефугиумах в пределах современного ареала, как северных, так и южных. Северный рефугиум расы Нерусса мог располагаться в пределах Среднерусской возвышенности, где известен центр расселения широколиственных пород в голоцене [32], и в бассейне Днепра по Десне, откуда известна лесная фауна

млекопитающих на максимальной стадии последнего ледниковья (24–18 тыс. л. н.) [45]. Южный рефугиум этой расы мог существовать в северном Приазовье на территории Донецкого кряжа. На максимальной стадии последнего ледниковья здесь сохранялся рефугиум лесной растительности с участием *Picea*, *Pinus*, *Betula*, *Salix*, *Abies* [46]. Современная генетическая подразделенность этой хромосомной расы может быть следствием ее прошлой рефугиальной структуры.

В нашей работе филогеографическая структура определялась фрагментированностью ареала вида, а не его кариотипическими особенностями. Отдельные филогруппы выделяются из популяций фрагментированных участков ареала (Сок, Нерусса), а не на основании хромосомных различий (все расы Валдая относятся к общей линии, к ней же относится Кириллов; Нерусса подразделяется на две линии независимо от кариотипа, вероятно, вследствие фрагментации).

Работа проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ № 10-04-00357, 11-04-09518, 12-04-32035-мол_а), гранта Президента МК-3755.2014.4 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Живая природа: современное состояние и проблемы развития”, подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Щипанов Н.А., Булатова Н.Ш., Демидова Т.Б., Бобрецов А.В. Хромосомные расы обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus* L.) на европейском северо-востоке России: ограничивают ли физические преграды их распространение? // Докл. АН. 2008. Т. 422. № 5. С. 714–717.
2. Hanski I. Metapopulation Ecology. Oxford; N.Y.: Oxford Univ. Press, 1999. 328 p.

3. *Wójcik J.M., Borodin P.M., Fedyk S. et al.* The list of the chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* (updated 2002) // *Mammalia*. 2003. V. 67. № 2. P. 169–178.
4. *Орлов В.Н., Булатова Н.Ш., Козловский А.И., Балакирев А.Е.* Иерархия внутривидовых таксонов обыкновенной бурозубки, *Sorex araneus* (Insectivora), и таксономическая структура вида млекопитающих // *Зоол. журн.* 2004. Т. 83. № 2. С. 199–212.
5. *Щипанов Н.А., Булатова Н.Ш., Павлова С.В., Щипанов А.Н.* Обыкновенная бурозубка (*Sorex araneus*) – модельный вид эколого-эволюционных исследований // *Зоол. журн.* 2009. Т. 88. № 8. С. 975–989.
6. *Orlov V.N., Borisov Y.M.* Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Mammalia: Insectivora) from the south part of Valdai Heights (Russia) // *Comp. Cytogenet.* 2007. V. 1. № 2. P. 101–106.
7. *Ohdachi S., Masuda R., Abe H. et al.* Phylogeny of Eurasian Soricine shrews (Insectivora, Mammalia) inferred from the mitochondrial cytochrome *b* gene sequences // *Zool. Sci.* 1997. V. 14. № 3. P. 527–532.
8. *Ohdachi S., Dokuchaev N.E., Hasegawa M., Masuda R.* Intraspecific phylogeny and geographical variation of six species of northeastern Asiatic *Sorex* shrews based on the mitochondrial cytochrome *b* sequences // *Mol. Ecol.* 2001. V. 10. № 9. P. 2199–2213.
9. *Банникова, А.А., Лебедев В.С.* Молекулярно-генетическая неоднородность кавказской землеройки-бурозубки *Sorex satununi* (Mammalia, Lipotyphla, Soricidae) по маркерам мтДНК как вероятное следствие древней гибридизации // *Мол. биология.* 2010. Т. 44. № 4. С. 658–662.
10. *Hall T.A.* BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids symposium series.* 1999. V. 41. P. 95–98.
11. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
12. *Nei M.* *Molecular Evolutionary Genetics.* Reprint edition. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
13. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. № 3. P. 564–567.
14. *Tanaka T., Nei M.* Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins // *Mol. Biol. Evol.* 1989. V. 6. № 5. P. 447–459.
15. *Excoffier L.* Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model // *Mol. Ecol.* 2004. V. 13. № 4. P. 853–864.
16. *Harpending H.C.* Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution // *Hum. Biol.* 1994. V. 66. № 4. P. 591–600.
17. *Mantel N.* The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Res.* 1967. V. 27. P. 209–220.
18. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. P. 2537–2539.
19. *Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V. et al.* New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0 // *Syst. Biol.* 2010. V. 59. № 3. P. 307–321.
20. *Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 8. P. 772.
21. *Rambaut A.* FigTree: English. 2012.
22. *Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
23. *Fumagalli L., Taberlet P., Stewart D. et al.* Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* Shrews (Soricidae: Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data // *Mol. Phyl. Evol.* 1999. V. 11. № 2. P. 222–235.
24. *Ratkiewicz M., Fedyk S., Banaszek A. et al.* The evolutionary history of the two karyotypic groups of the common shrew, *Sorex araneus*, in Poland // *Heredity.* 2002. V. 88. № 4. P. 235–242.
25. *Andersson A.-C., Alström-Rapaport C., Fredga K.* Lack of mitochondrial DNA divergence between chromosome races of the common shrew, *Sorex araneus*, in Sweden. Implications for interpreting chromosomal evolution and colonization history // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 9. P. 2703–2716.
26. *White T.A., Searle J.B.* The colonization of Scottish islands by the common shrew, *Sorex araneus* (Eulipotyphla: Soricidae) // *Biol. J. Linn. Soc.* 2008. V. 94. № 4. P. 797–808.
27. *Распопова А.А., Щипанов Н.А.* Изменчивость участка цитохрома *b* в разных хромосомных расах и популяциях обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L., 1758 // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 4. С. 527–536.
28. *Orlov V.N., Kozlovsky A.I., Okulova N.M., Balakirev A.E.* Postglacial recolonisation of European Russia by the common shrew *Sorex araneus* // *Russ. J. Theriol.* 2007. V. 6. № 1. P. 97–104.
29. *Shchipanov N.A., Pavlova S.V.* Contact zones and ranges of chromosomal races of the common shrew, *Sorex araneus*, in north-eastern European Russia // *Folia Zool.* 2013. V. 62. № 1. P. 24–35.
30. *Lundqvist A.-C., Alström-Rapaport C., Tegelström H.* Fennoscandian phylogeography of the common shrew *Sorex araneus*. Postglacial recolonisation—combining information from chromosomal variation with mitochondrial DNA data // *Acta Theriol.* 2011. V. 56. № 2. P. 103–116.
31. *Ивантер Э.В., Макаров А.М.* Территориальная экология землероек-бурозубок (Insectivora, *Sorex*). Петрозаводск: Петрозаводск. гос. ун-т, 2001. 272 с.
32. *Кожаринов А.В.* Динамика неморальных широколиственных лесов Восточной Европы в позднеледниковье—голоцене // *Закономерности вековой динамики биогеоценозов. XXI Чтения памяти академика В.Н. Сукачева.* М: Т-во науч. изданий КМК, 2006. С. 66–125.
33. *Аксенов Д.Е., Добрынин Д.В., Дубинин М.Ю. и др.* Атлас малонарушенных лесных территорий России. М.: МСо-ЭС., 2003. 187 с. URL — http://old.forest.ru/eng/publications/intact/es_b.html

34. Григорьева О.О., Шестак А.Г., Потапов С.Г. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов и поток генов в зоне контакта четырех хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Mammalia) // Изв. АН. Сер. биол. 2011. № 5. С. 501–510.
35. Horn A., Basset P., Yannic G. et al. Chromosomal rearrangements do not seem to affect the gene flow in hybrid zones between karyotypic races of the common shrew (*Sorex araneus*) // Evolution. 2012. V. 66. № 3. P. 882–889.
36. Орлов В.Н., Козловский А.И., Балакирев А.Е., Борисов Ю.М. Эндемизм хромосомных рас обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) и возможность сохранения рефугиумов в области покровного оледенения Поздневалдайской эпохи // Докл. АН. 2007. Т. 416. № 6. С. 841–844.
37. Орлов В.Н., Борисов Ю.М., Черепанова Е.В., Мулишников А.Н. Ассортативное скрещивание в гибридных зонах хромосомной расы Западная Двина обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* (Mammalia) // Докл. АН. 2013. Т. 1. № 451. С. 110–113.
38. Taberlet P., Fumagalli L., Hausser J. Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: Tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora) // Evolution. 1994. V. 48. № 3. P. 623–636.
39. Jadwiszczak K.A., Ratkiewicz M., Banaszek A. Analysis of molecular differentiation in a hybrid zone between chromosomally distinct races of the common shrew *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae) suggests their common ancestry // Biol. J. Linn. Soc. 2006. V. 89. № 1. P. 79–90.
40. Polly P.D. Phylogeographic differentiation in *Sorex araneus*: morphology in relation to geography and karyotype // Russ. J. Theriol. 2007. V. 6. № 1. P. 73–84.
41. Григорьева О.О., Опарин М.Л., Потапов С.Г., Орлов В.Н. Генетическая структура изолированной популяции обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. (Mammalia) по данным изменчивости микросателлитных локусов // Докл. АН. 2012. Т. 2. № 446. С. 232–233.
42. Щипанов Н.А., Булатова Н.Ш., Опарин М.Л. Островная популяция расы Сок обыкновенной бурозубки (Insectivora: Mammalia) на южной границе ареала // Докл. АН. 2002. Т. 386. № 3. С. 427–429.
43. Орлов В.Н., Козловский А.И., Потапов С.Г. и др. Молекулярно-генетические методы в исследовании рефугиальной структуры ареалов видов в позднем плейстоцене–голоцене. Динамика современных экосистем в голоцене. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2006. С. 174–179.
44. Агаджанян А.К. Мелкие млекопитающие плиоцен-плейстоцена Русской равнины. М.: Наука, 2009. 676 с.
45. Маркова А.К., Пузаченко А.Ю. Комплексы млекопитающих максимальной стадии последнего оледенения (Last Glacial Maximum – LGM) (<24.0–≥17.0 тыс. л. н.) // Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24 – 8 тыс. л. н.). М.: Т-во науч. изданий КМК, 2008. С. 117–160.
46. Симакова А.Н., Пузаченко А.Ю. Растительность в максимальное похолодание последнего оледенения (LGM) (<24.0–≥17.0 тыс. л. н.) // Эволюция экосистем Европы при переходе от плейстоцена к голоцену (24–8 тыс. л.н.). М.: Т-во науч. изд. КМК, 2008. С. 315–341.

Genetic Structure of the Common Shrew *Sorex araneus* L. 1758 (Mammalia, Lipotyphla) in Continuous and Fragmented Areas

O. O. Grigoryeva^a, Yu. M. Borisov^a, V. V. Stakheev^b,
A. E. Balakirev^a, D. M. Krivonogov^c, and V. N. Orlov^a

^a Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117071 Russia
e-mail: grig_forever@mail.ru

^b Institute of Arid Zones of the Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, 344006 Russia

^c Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Arzamas Branch, Arzamas, 607220 Russia

In this work the genetic variability of the common shrew populations *Sorex araneus* L. in Eastern Europe was studied via sequencing of the mitochondrial gene *cyt b*. A total of 82 sequences of the mitochondrial gene *cyt b* with a length of 953 basepairs were analyzed, including five chromosome races in a continuous area of the species in forest zone and two races in fragmented area in the steppe zone. Phylogeographic subdivision of the common shrew was not expressed, and there was no significant correlation between genetic and geographic distances in continuous areas. We did not acquire convincing evidence of the influence of narrow hybrid zones between chromosome races on the flow of neutral alleles. A significant *p*-distance ($0.69 \pm 0.27\%$) of geographically close populations of the chromosome race Neroosa indicates the formation of the karyotype of this race in the Pliocene or Pleistocene. In our work, the phylogeographic structure was determined more by species area fragmentation than by its karyotypic features.

English translation of the paper is published in “Russian J. Genetics” (2015, vol. 51, no. 6), www.maik.ru.