

Важнейшие результаты, полученные в ходе реализации Проекта (развернутый вариант)

Предварительные данные позволяют предполагать, что европейская популяция обыкновенной бурозубки и европейский крот имеют сходные филогеографические паттерны, которые могут быть следствием сходной истории этих групп во времена позднего плейстоцена-голоцена.

Аналогами происходящих из средиземноморских рефугиумов гаплогрупп европейского крота в этом сравнении могут выступать близкие к обыкновенной бурозубке *S. antinorii*, *S. granarius* и *S. coronatus*. Обширная и слабо дифференцированная по митохондриальной ДНК центрально-европейская группа *T. europaea* сходна с обыкновенной бурозубкой в европейской части ее ареала.

На сибирской части ареала популяция обыкновенной бурозубки не имеет выраженной структуры, в отличие от имеющего сходное распространение сибирского крота *T. altaica*.

Для *Crocidura lasiura* была показана значительная, по сравнению с *M. robusta* подразделенность и обособленность южнокорейской выборки.

Далее приведены результаты исследования по отдельным таксономическим группам.

Молекулярная филогеография видов родов *Talpa* и *Mogera*.

Для *T. europaea* было показано, что классическая гипотеза средиземноморских рефугиумов в значительной степени верна для данного вида. Результаты анализа генетического разнообразия и демографический анализ показывают, что рефугиумы данного вида скорее всего находились в северной Италии (откуда он быстро распространился в центральную Италию), на Балканах, на северном и восточном побережье Черного моря и юге Франции, что подтвердило данные, полученные ранее Феуда с соавторами (Feuda et al., 2015).

Для сибирского крота *T. altaica* было выделено три группировки, соответствующие трем географическим локалитетам (Новосибирск, оз. Телецкое, ст. Мирное), с дистанциями между ними порядка 2% (Приложение, рис. 1). Полученные данные указывают на стабильность алтайских группировок, что означает относительно длительное и благополучное существование их на соответствующих участках ареала (в Tajima's D и Fu's FS тестах выборки имеют значение $p > 0.05$, следовательно, подтверждалась 0-гипотеза об их стабильности. Анализ распределения попарных нуклеотидных дистанций в выборках также указывает на их стабильность).

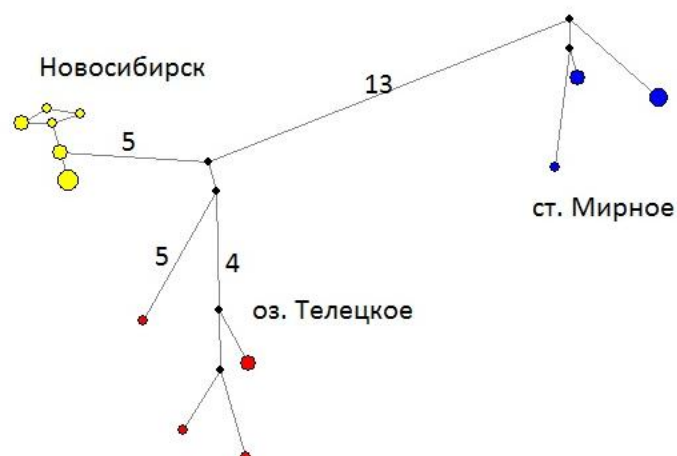


Рис. 1. Медианная сеть гаплотипов для *T. altaica* по анализу 1140 п.н. *cytb*. Цифрами показано количество замен, разными цветами – географические локалитеты.

Для *Mogera robusta* было выделено два центральных гаплотипа (H1 и H2), которые несут образцы из Приморья, Южной Кореи и Китая. (Приложение рис. 2). Все гаплотипы формируют две гаплогруппы. Следует обратить внимание, что образцы из южного и северного Хасана не имеют общих гаплотипов с образцами других частей Дальнего Востока.

Для обеих групп было показано высокое гаплотипическое ($0,7460 \pm 0,0571$ и $0,7618 \pm 0,0514$) и низкое нуклеотидное ($0,000956 \pm 0,000721$ и $0,001339 \pm 0,000900$) разнообразия, что говорит о том, что эти популяции в течение короткого времени произошли от предковых популяций с низким значением эффективной численности и в течение этого времени они успели восстановить только гаплотипическое разнообразие через мутации, а для восстановления высокого нуклеотидного разнообразия этого времени оказалось недостаточно (Avice, 2000).

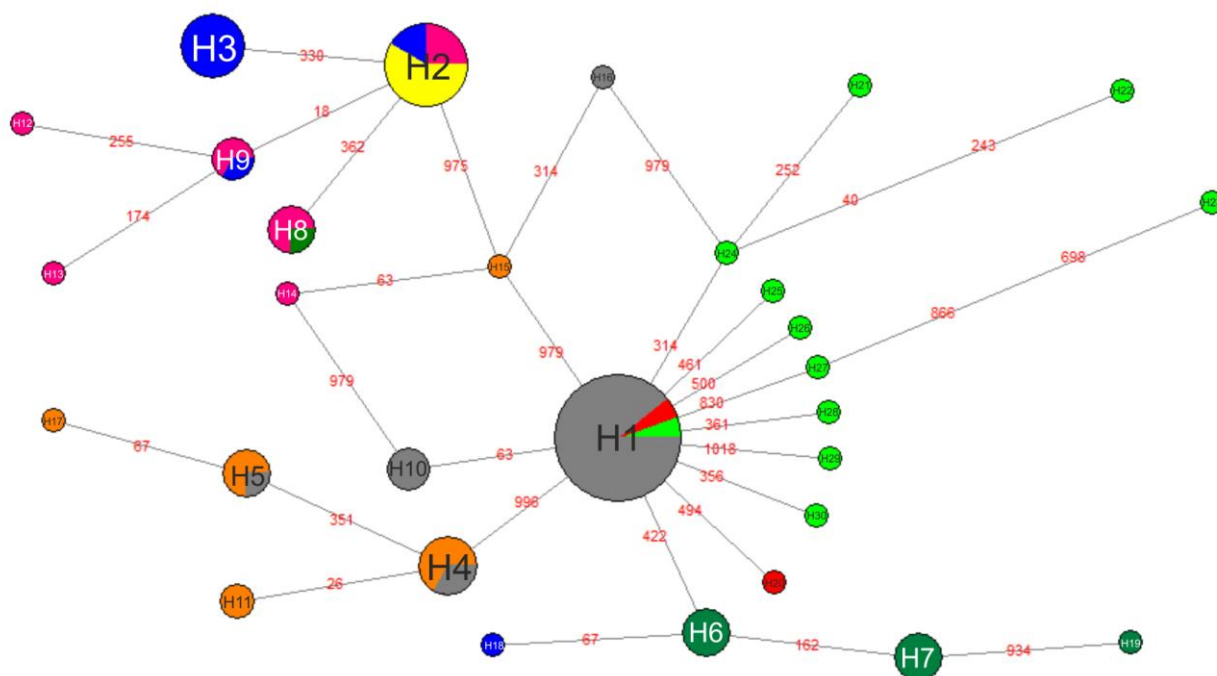


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов для *M. robusta* по анализу 1140 п.н. *cyt b*. Цифрами показано количество замен, разными цветами – географические локалитеты, цифрами – обозначения гаплотипов (подробнее в табл.1).

Табл. 1. Обозначения к медианной сети гаплотипов.

локалитет	обозначение	Н образцов	гаплотип
Южный Хасан		37	H1, H4, H5, H10, H16
Северный Хасан		11	H4, H5, H11, H15, H17
СВ Приморье		7	H2
Сихотэ-Алинский заповедник		11	H2, H8, H9, H12, H13, H14
Лазовский заповедник		11	H2, H3, H9, H18
Уссурийский заповедник		10	H6, H7, H8, H19
Южная Корея		12	H1, H21-H30
Китай		3	H1, H20

Результаты филогеографического анализа, анализа генетического разнообразия, демографического анализа и анализа распределения попарных нуклеотидных дистанций указывают на то, что популяции континентальных мoger молодых и находятся в стадии экспансии.

На внутривидовую изменчивость представителей рода *Mogera* также как и на внутривидовую изменчивость других кротов не могла не повлиять эпоха плейстоценовых оледенений (Feuda et al., 2015). Вероятно, плейстоценовые рефугиумы Корейского полуострова – горный хребет Баекдудаеган (Baekdudaegan) (Chung et al., 2014) или северного Китая в районе Желтого моря (Kangming et al., 2008), а также Приморья (Берман и др., 2005) сыграли важную роль в видообразовании континентальных мoger. Возможно, в этих рефугиумах мogerы и пережидали неблагоприятные условия, а после отступления ледника произошло их дальнейшее расселение. В поддержку этих данных говорит и тот факт, что данный вид является одним из самых молодых. По полученным нами данным время отделения *M. robusta* от группы *M. robusta*/*M. wogura* оценивается в 0.6 млн. л.н. (Приложение рис. 3). Низкая генетическая дистанция между образцами из Приморья, Южной Кореи и Китая (~ 0.23%) также поддерживает наше предположение.

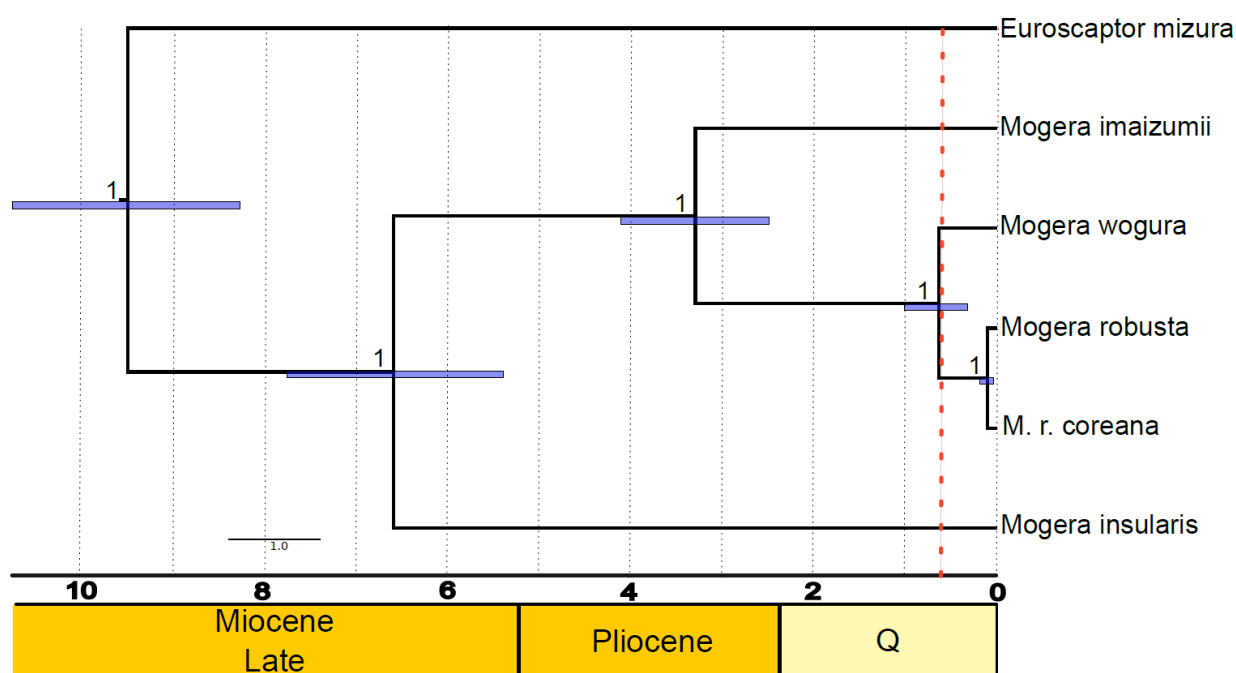


Рис. 3. Временная шкала крупных событий дивергенции в роде *Mogera* на основании конкатенированной последовательности 12 ядерных генов (BEAST).

По результатам анализа митохондриального гена *cytb* и 12 экзонов ядерных генов (Приложение рис. 4), нами был подтвержден видовой статус уссурийской мogerы - *M. robusta*. Что касается формы «coreana», то его стоит рассматривать в качестве подвида *M. robusta*.

По результатам данного исследования подготовлена публикация «Genetic and taxonomic diversity of the moger from Far East and Korean Peninsula» в журнал Journal of the Linnean Society.

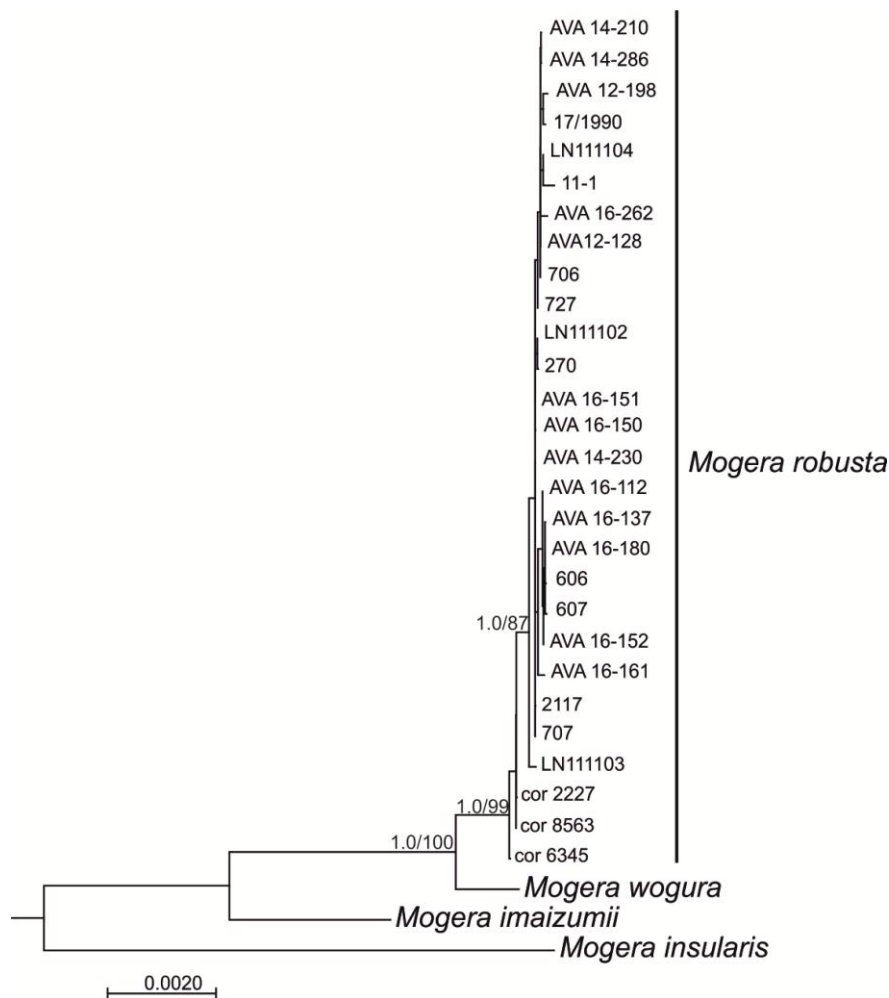


Рис. 4. Результаты ML анализа по конкатенированной последовательности 12 ядерных генов.
. Числа вблизи узлов - показатели бутстрэп-поддержек.

Изменчивость митохондриальной ДНК *Crocidura lasiura*

По предварительным данным, структура изменчивости *C. lasiura*, отличается от таковой для *M. robusta*. Прежде всего, обращают на себя внимание большие межгрупповые дистанции: более 1% между выборками из Приморья, Китая и Южной Кореи. Внутригрупповые дистанции для южнокорейской и приморской выборок составили 0.5% и 0.3%, соответственно.

При этом в отличие от могов, для которых показана, близость гаплотипов из Южной Кореи, Китая и южной части Приморья, *C. lasiura* демонстрирует большую подразделенность – южнокорейские последовательности далеко отстоят на гаплотипической сети от приморских и, вероятно, образуют отдельную гаплогруппу (Приложение рис. 5).

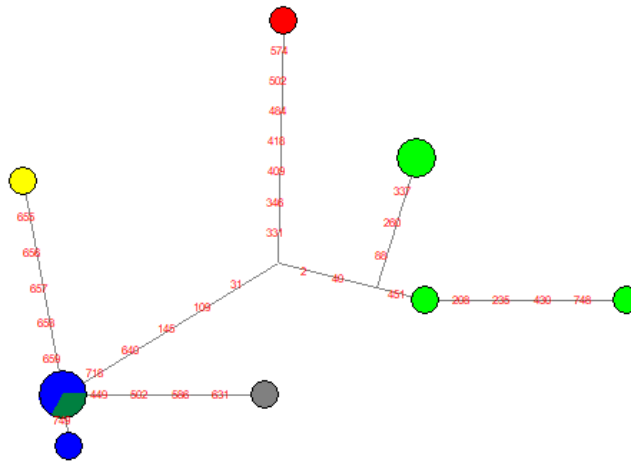
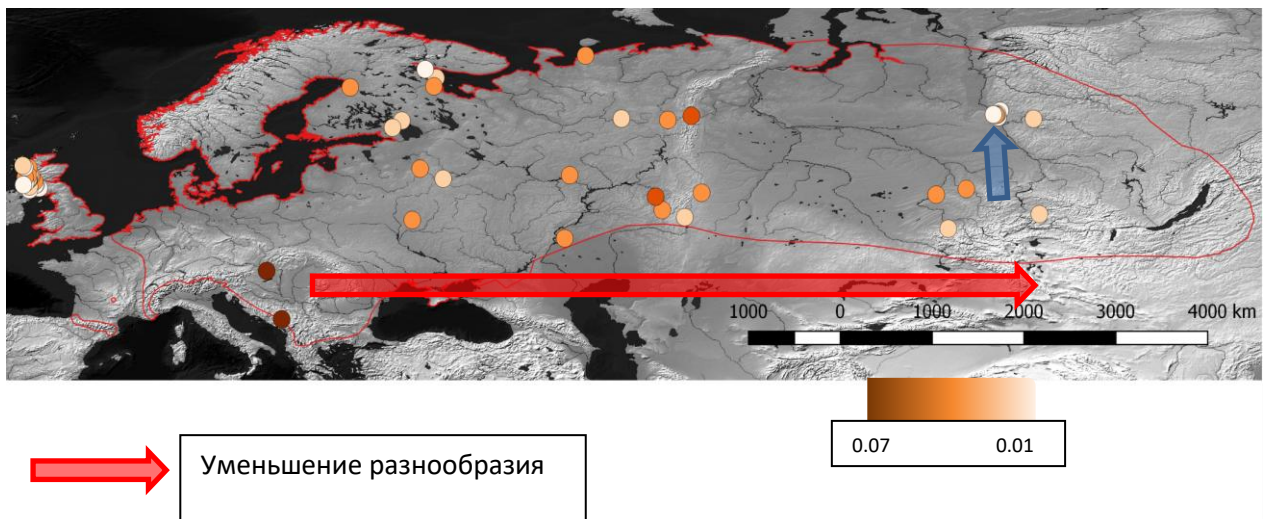


Рис. 5. Медианная сеть гаплотипов *C. lasiura* митохондриального гена *cytb* на основании оригинальных последовательностей и последовательностей, депонированных в Генбанке. Обозначения цветов соответствуют географии из табл. 1.

Изменчивость митохондриальной ДНК *Sorex araneus*

Для оценки изменчивости митохондриальной ДНК на ареале обыкновенной бурозубки нами было секвенировано более 350 последовательностей *cytb*. Таким образом, к настоящему моменту в нашем распоряжении находится 567 последовательности *cytb* более чем 100 локалитетов, включая депонированные в ГенБанке.

В целом, нуклеотидное разнообразие демонстрирует тенденцию к уменьшению в направлении с запада на восток (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, $r = -0.52$, $p < 0.05$), для гаплотипического этой тенденции не выявлено ($r = -0.33$, $p = 0.12$). Приложение рис. 6.



Уменьшение разнообразия

0.07 0.01

Рис. 6. Распределение нуклеотидного разнообразия обыкновенной бурозубки на ареале. Уменьшение разнообразия в направлении с запада на восток и с юга на север (в Сибири).

Значительное понижение генетического разнообразия на территории Сибири отражает также генетический ландшафт. На европейской части ареала генетическая гетерогенность максимальна на юго-западе и понижается в северных областях. Приложение рис. 7.

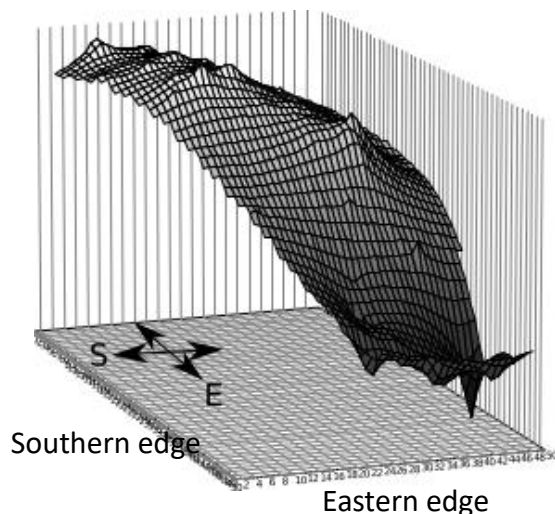


Рис. 7. Генетический ландшафт для обыкновенной бурозубки – интерполяция генетических дистанций на пространстве географических координат. По осям X и Y обозначены географические координаты. Высота пиков отражает генетическую дистанцию. Демонстрирует убывание генетического разнообразия в направлении с запада на восток и повышенную генетическую разнородность в южной Европе.

Зависимость генетической дистанции от географической (изоляция расстоянием) оказалась небольшой, но значимой (тест Мантелла, $r = 0.19$, $p < 0.001$).

Исследование генетических дистанций между различными выборками методами кластеризации, многомерного шкалирования, пространственного анализа молекулярной изменчивости демонстрирует обособленность выборок с территории Сибири.

Этот результат подтверждается структурой медианной сети гаплотипов (Приложение рис. 8), на которой большая часть образцов с территории Сибири несут гаплотипы, объединяющиеся в гаплогруппу, отделенную от «европейской» части сети 3 заменами.

Вместе с тем, на территории западной Сибири (окрестности г. Омск, Тюмень, пос. Карасук) нами были обнаружены гаплотипы только европейской группы. Европейские гаплотипы, с небольшой частотой встречаются также в окрестностях г. Новосибирск, Томск, на левобережье Енисея, в его среднем течении (Приложение рис. 9).

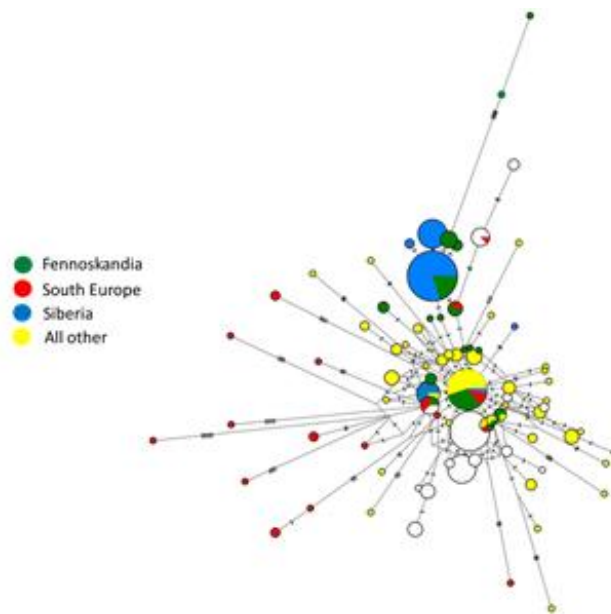


Рис. 8. Медианная сеть гаплотипов *cyt b Sorex araneus*. Длины ветвей пропорциональны количеству замен.

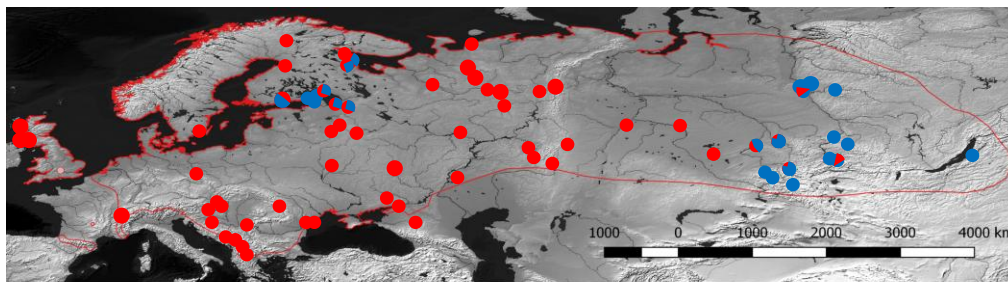


Рис. 9. Распределение гаплотипов «сибирской» и «европейской» линий на ареале обыкновенной бурозубки

Изменчивость митохондриального гена ND2.

Мы получили также последовательности митохондриального гена ND2 для 41 образца из 21 локалитета с территории Сибири и Европы. Сибирские гаплотипы выделяются в отдельную группу на медианной сети гаплотипов. Также отдельную группу на медианной сети составляют гаплотипы западной Сибири (Приложение рис. 10).

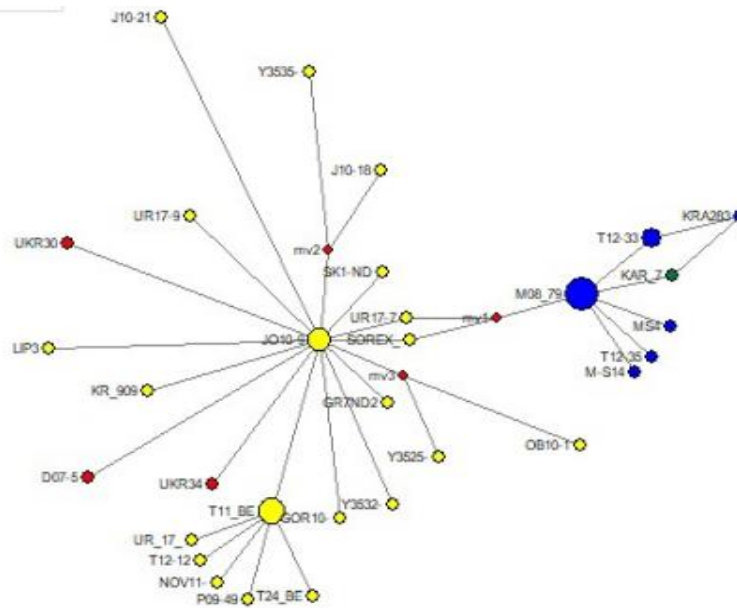


Рис. 10. Медианная сеть гаплотипов *ND2 Sorex araneus*. Длины ветвей пропорциональны количеству замен.

Послеледниковая реколонизация ареала *Sorex araneus*.

Для оценки времен основных событий на ареале обыкновенной бурозубки прежде всего необходимо получить адекватное представление о скорости нуклеотидных замен в исследуемом фрагменте ДНК. При оценке скорости молекулярной эволюции на относительно небольших временах следует иметь в виду феномен замедления молекулярных часов со временем, вызванный прежде всего, постепенным исчезновением условно-нейтральных замен под действием очищающего отбора. Тест Макдональда-Крейтмана показал нарушение отношения синонимичных и несинонимичных замен в пределах вида по сравнению с межвидовым полиморфизмом (нами были оценены эти отношения для пар *S.araneus/S.tundrensis*, *S.araneus/S.samniticus*, *S.araneus/S.caecutiens*, табл. 1 приложения). Чтобы избежать влияния зависимости оценки скорости замещения от времени дивергенции, для калибровки молекулярных часов мы использовали относительно недавние, плейстоценовые, события у палеарктических видов бурозубок. Применяемая для дальнейшего датирования оценка скорости составила 19.7%.

Анализ демографической истории показывает все признаки недавней экспансии, как для всего вида в целом, так и на территории Европы и Сибири в отдельности. Об этом говорит общий характер изменения эффективной численности во времени, оцененный методом BSP (Bayesian Skyline Plot), унимодальный характер распределения попарных нуклеотидных различий, достоверно отрицательные значения тестов на нейтральность Таджимы и Фу. Датирование показывает, экспансия на территории Европы произошла не позднее окончания Позднего Дриаса. Время экспансии *Sorex araneus* на территории Сибири соответствует концу пре-бореального, началу бореального периода голоцена, когда активно восстанавливался лесной покров.

Экспансия в пределах отдельных регионов на территории Европы, а частности – северо-восток, Европы, центральная часть восточной Европы в соответствии с нашим датированием

происходила вероятно уже в голоценовые времена, причем самой молодой из исследованных оказалась популяция северо-востока Европы, время ее экспансии оценено нами в 5000 лет.

Мы также оценили времена дивергенции отдельных популяций обыкновенной бурозубки, с помощью байесова анализа, реализованного в программе IMA.

Дивергенция между венгерскими и польскими популяциями по нашим данным произошла приблизительно 13 т.л.н., то есть до наступления похолодания Позднего Дриаса. Дивергенция между Сибирью и северо-востоком Европы относительно молодая – около восьми тысяч лет назад. Сходное время дивергенции получено нами и для пар Англия-Альпы, Альпы-Польша, Польша – северо-запад России, раса Москва – южные популяции расы Нерусса.

Поздняя дивергенция сибирских и европейских популяций указывает на то, что существование отдельного ледникового рефугиума в Сибири на протяжении LGM маловероятно.

Мы предполагаем, что наши данные лучше всего согласуются с гипотезой о том, что в период LGM бурозубка сохранялась в единственном рефугиуме. Хотя и вопрос о положении рефугиумов нельзя считать решенным, но учитывая, что самая ранняя из полученных нами дивергенций оказались между европейскими выборками, а также обращая внимание на положение южноевропейских гаплотипов на медианной сети, мы можем предположить, что рефугиум располагался в районе Карпат, что согласуется с данными для других мелких млекопитающих, в частности для рыжей полевки.

Вместе с тем, окончательное формирование современной структуры ареала обыкновенной бурозубки можно объяснить с помощью разных сценариев. Наши данные не противоречат гипотезе о существовании вторичных рефугиумов в позднем Дриасе. В это время отдельные популяции обыкновенно бурозубки могли сохраняться на юге современной России, на Урале.

По полученным результатам подготовлена статья «Филогеография и демографическая история обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L., 1758 (Eulipotyphla, Mammalia)» в журнал «Генетика».

Модель внезапной экспансии – ограничение применения в сложных ситуациях.

При исследовании демографической истории для оценки времени увеличения численности вида на той или иной территории нередко используется модель внезапной экспансии (Rogers and Harpending, 1992). Степень чувствительности этой, достаточно простой, модели к нарушению изначальных допущений, в частности, к подразделенности популяции, остается неясной.

Модель внезапной экспансии тестировалась нами в ситуации, когда современная популяция образуется в результате смешения двух прежде изолированных популяций. Подобная ситуация является реалистичной и может возникнуть, например, во время послеледникового расширения ареала, когда изолированные во время оледенения рефугиальные популяции испытывают рост численности и за счет увеличения скорости миграции/колонизации образуют смешанные популяции. Симуляции были проведены в программах fastsimcoal2 (ver 2.5.2.21) и

Arlequin 3.1 с использованием параметров, соответствующих оценке демографической истории *Sorex araneus* L, 1758 (Mammalia, Lipotyphla).

Оценка времени экспансии (τ) демонстрирует бифазную зависимость от времени разделения популяций (t) и оказывается несколько завышенной при невысоких t и существенно заниженной в случае, если t достаточно велико. Несмотря на то, что в последнем распределение попарных нуклеотидных дистанций оказывается мультимодальным, тесты Таджимы и Фу указывают на рост численности, а raggedness index и SSD не позволяют отвергнуть модель внезапной экспансии.

По нашему мнению, при оценке времени экспансии популяции модель внезапной экспансии должна использоваться с осторожностью в тех случаях, когда можно подозревать смешанное происхождение популяции.