

## АНАЛИЗ МЕЖВИДОВЫХ РАЗЛИЧИЙ ПЯТИ ВИДОВ ЗЕМЛЕРОЕК (*LIPOTURHILA*: *SORICIDAE*): МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДАННЫЕ

© 2014 Д.М. Шадрин, Я.И. Пылина, А.Н. Королев.

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

Поступила 14.10.2014

В данной статье дана оценка корреляции морфологической (краниометрической) и генетической (мтДНК) межвидовой изменчивости пяти видов семейства Землеройковые европейского северо-востока России.

**Ключевые слова:** геометрическая морфометрия, молекулярная филогения, мтДНК, *Sorex minutus*, *S. caecutiens*, *S. isodon*, *S. araneus*, *Neomys fodiens*, Soricidae.

### ВВЕДЕНИЕ

Многие представители семейства Землеройковые подразделены на ряд форм, отличающихся как по уровню, так и качеству различий, в связи с чем возникают проблемы в определении структурированности вида и его границ. Поэтому как отечественные, так и зарубежные исследователи все чаще обращают внимание на соотношение морфологической и генетической изменчивости, что, по мнению многих авторов, является одной из основных задач современной эволюционной биологии. Этому вопросу посвящено множество исследований, касающихся различных таксономических групп, результаты некоторых выявили значительную связь между уровнем молекулярных и морфологических различий [5, 8]. Другие исследователи не нашли такой зависимости [4].

Цель данной работы – оценка соотношения межвидовых морфологической (краниометрической) и генетической (изменчивость мтДНК) изменчивости пяти видов семейства Землеройковые: малой (*Sorex minutus* Linnaeus, 1766), средней (*S. caecutiens* Laxmann, 1788), равнозубой (*S. isodon* Turon, 1924) и обыкновенной (*S. araneus* Linnaeus, 1758) бурозубок и обыкновенной кутуры (*Neomys fodiens* (Pennant, 1771)).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения межвидовых морфологических различий методом геометрической морфометрии проанализировано 46 черепов землероек (рис. 2): №№ образцов *S. minutus*: 14, 16, 24, 32, 34, 38, 40, 41 (место и год отлова: п. Пырский Котласского района Архангельской области, 2004); №№ образцов *S. caecutiens*: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 42

(п. Приозерный Корткеросского района Республики Коми, 1999-2001); №№ образцов *S. isodon*: 11, 12, 44 (п. Пырский; с. Гам Усть-Вымского района Республики Коми, 2008 г.); №№ образцов *S. araneus*: 13, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 27, 28 (п. Пырский); №№ образцов *Neomys fodiens*: 21, 22, 26, 29, 30, 31, 33, 35, 36, 37, 39, 43, 45 (п. Пырский). В качестве переменных использовали прокрустовы координаты (PrC), прокрустовы дистанции (PrD) и переменные формы (Relative Warps, RW). Каждую переменную рассчитывали стандартными методами [2, 10] с использованием программы MorphoJ. Анализировали оцифрованные (разрешение 2400 dpi) изображения латеральной стороны правой ветви нижней челюсти, полученные с помощью сканера Epson Perfection 3490 Photo. Форма каждого объекта (нижняя челюсть) была описана декартовыми координатами с использованием 16 меток (рис. 1).

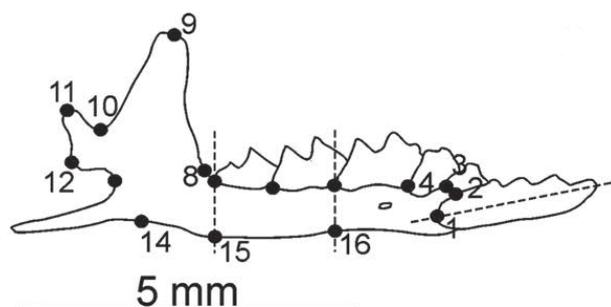


Рис. 1. Метки на латеральной стороне нижней челюсти, используемые в исследовании

Для расстановки меток использовали программу tpsDig ver. 1.40. Кластерный анализ проводили в программном пакете PAST ver. 1.79. Соответствие между матрицей PrD и дендрограммой определяли по коэффициенту кофенетической корреляции.

Для проведения молекулярно-филогенетического анализа использовали последовательности *cyt b* мтДНК, взятые из базы данных GenBank (NCBI, USA) и полученные на базе ЦКП «Молекулярная биология» Института био-

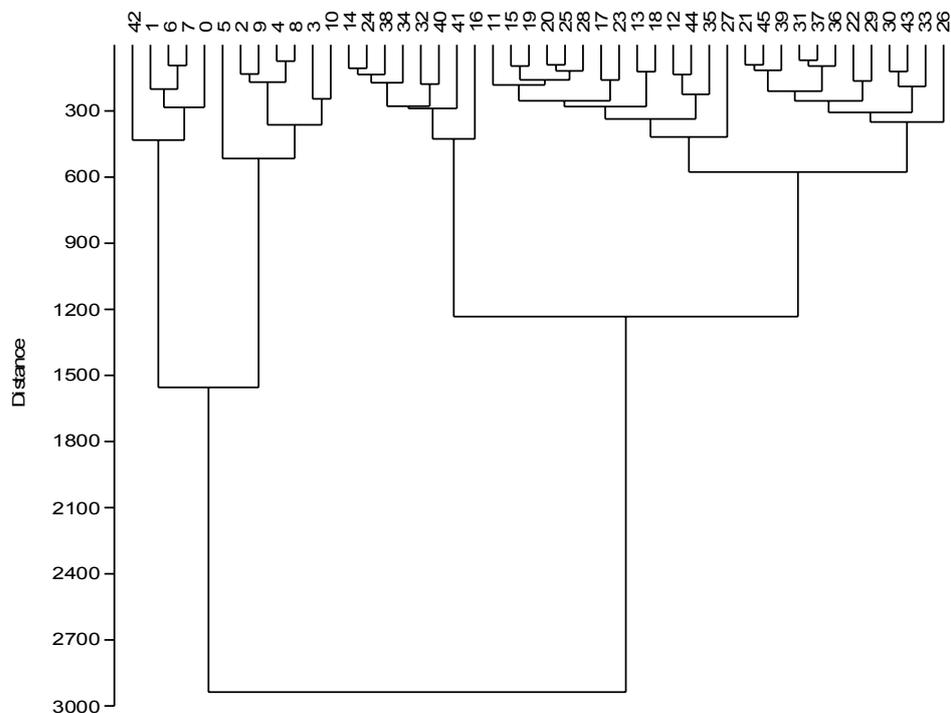
Шадрин Дмитрий Михайлович, научный сотрудник центра коллективного пользования «Молекулярная биология», shdimas@ya.ru; Королев Андрей Николаевич, ведущий инженер лаборатории экологии наземных позвоночных, korolev@ib.komisc.ru; Пылина Яна Игоревна, инженер центра коллективного пользования, pylina@ib.komisc.ru

логии Коми НЦ УрО РАН. Выделение ДНК производили с помощью набора «FastDNASpinKit» («QBioGene», Канада) согласно инструкциям производителя. Выделенную ДНК хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл ScreenMix («Евроген», Россия), 5 мкл каждого праймера (0.3 мкМ), 9.0 мкл воды без нуклеаз («Ambion», США) и 1.0 мкл геномной ДНК (1–100 нг). Для амплификации последовательности гена *cut b* использовали общепринятые праймеры L14734 и H15985 [7]. Секвенирование проводили с использованием набора реагентов ABI PrismBigDyeTerminator v. 1.1 на приборе ABI PRISM 310 GeneticAnalyzer («Applied Biosystems», США). Выравнивание последовательностей проводили вручную и автоматически с помощью программы ClustalW, филогенетический анализ осуществляли в программном пакете MEGA 4.0 [9]. Оценку корреляции между матрицами генетических и прокрустовых дистанций

проводили тестом Мантела [6].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В связи с тем, что выборки пяти видов землероек могли быть неоднородны на видовом уровне, т.е. содержать животных, отловленных в разные годы, в нескольких смежных биотопах или локалитетах, мы протестировали каждую выборку на соответствие распределения значений CS модели нормального распределения (Normality test). Тест Шапиро-Уилка выявил для всех пяти выборок, соответствующих разным видам, нормальное распределение ( $W_{\text{mandible}} = 0.925\text{--}0.933$ ,  $p > 0.05$ ). Тест Левине по размеру (CS) и форме (RW), проведенный для всех выборок, показал их однородность (значимость теста  $p > 0.05$ ). Таким образом, дальнейший анализ проводился по 5 выборкам. Кластерный анализ на основе матрицы PrD без подразделения на выборки позволил разделить образцы на две группы (рис. 2).

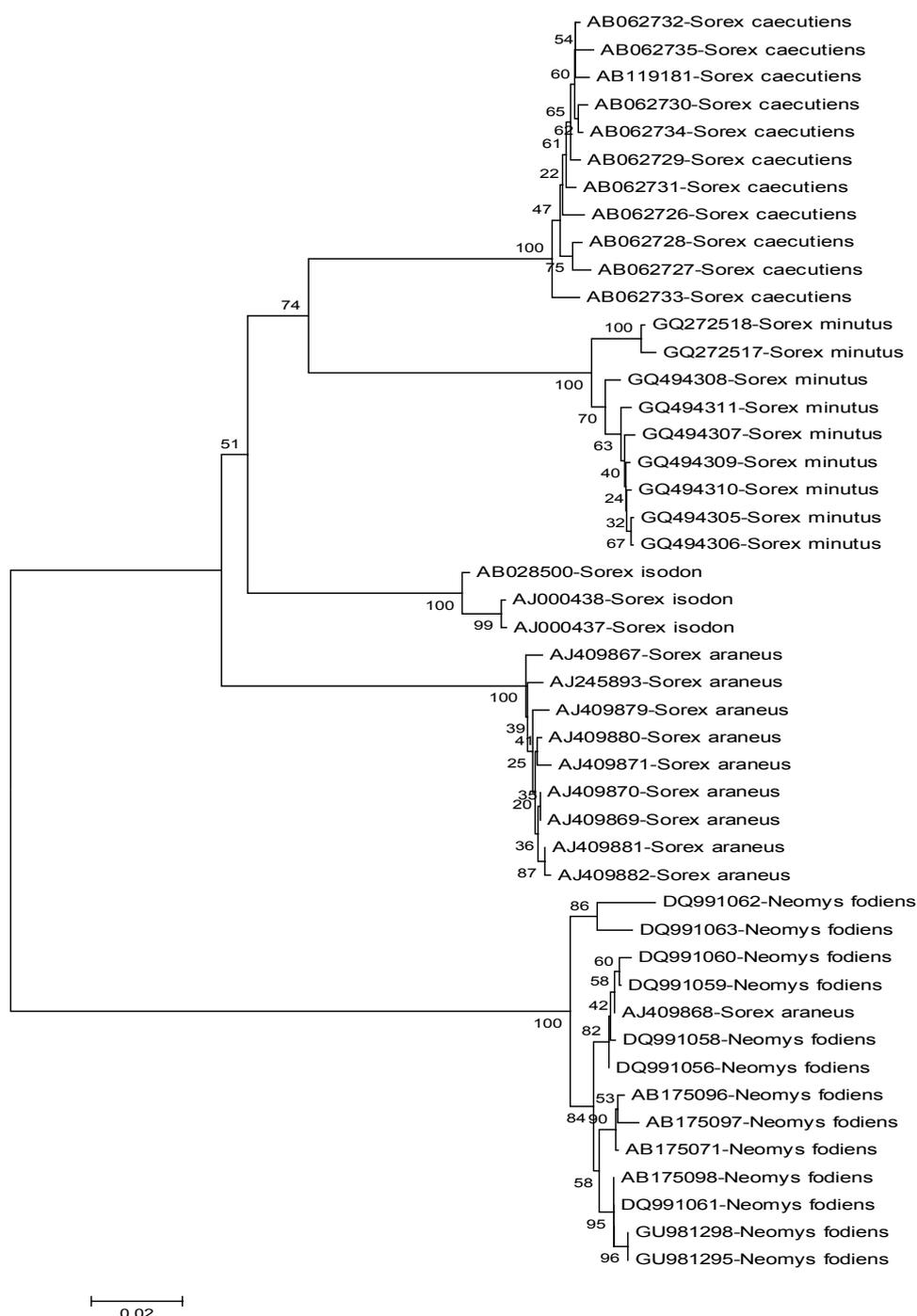


**Рис. 2.** Результаты кластерного анализа (метод UPGMA) на основе матрицы прокрустовых дистанций нижней челюсти землероек.

В первую вошли образцы *S. caecutiens*, во вторую – образцы *S. minutus*, *S. isodon*, *S. araneus*, *Neomys fodiens*. Образцы второй группы по форме нижней челюсти объединились в подгруппы по видовой принадлежности, но абсолютной кластеризации по четырем видам не произошло, за исключением подгруппы в которую вошли образцы *S. minutus*. Значения коэффициента кофенетической корреляции для матрицы дистанций по нижней челюсти ( $r=0.88$ ) удовлетворительно. Дискриминантный анализ пяти групп (видов) Землеройковых по нижней челюсти (PrC) выявил ста-

тистически значимые различия между всеми группами ( $p < 0.001$ ).

Полученные данные позволили выявить необычный на первый взгляд статус обыкновенной кутуры. А именно то, что кутура являющаяся представителем совсем иной трибы нежели остальные рассмотренные виды, относящиеся к роду *Sorex*, не образовала отдельный кластер на дендрограмме иллюстрирующей матрицу прокрустовых дистанций, а вошла в один кластер с равнозубой и обыкновенной бурозубками (рис. 2).



**Рис. 3.** Результаты молекулярно-филогенетического анализа пяти видов землероек (метод ближайшего связывания (NJ), коэффициент бутстрепа 1000).

Выявленный по морфологическим данным статус куторы обыкновенной относительно прочих рассматриваемых видов землероек, в первом приближении, можно попытаться объяснить явлением конвергенции. Морфология нижней челюсти во многом определяется пищевой специализацией видов. Обыкновенная кутора, равнозубая и обыкновенная бурозубки образуют кластер крупных видов землероек, потребляющих сравнительно крупные кормовые объекты. К сожалению, мы не располагаем сведениями о питании рассматриваемых видов землероек в районах их отлова и для подтверждения нашего предположе-

ния вынуждены использовать сведения по другим территориям. В частности, соотношение различных групп кормов в пищевых спектрах *S. isodon* и *S. araneus* в Печоро-Илычском заповеднике во многом идентичны (Млекопитающие..., 2004). Данные о питании куторы здесь крайне отрывочны, что не позволяет провести корректное сопоставление. Тем не менее, известно, что в желудках добытых зверьков находили мелкую рыбу и водных насекомых (последние, в большинстве своем представлены достаточно крупными видами). Наряду с насекомыми и моллюсками она добывает

также лягушек и мышевидных грызунов (Строганов, 1957).

Анализ молекулярно-филогенетических связей показал, что исследуемые образцы сгруппировались в пять кластеров, согласно их видовой принадлежности (рис. 3).

При этом видно, что образованное древо делится на два кластера соответствующих делению на трибы. В один кластер вошли представители трибы Neomyini – род *Neomys*, а во второй представители трибы Soricini – род *Sorex*. При детальном рассмотрении кластера, в который вошли представители рода *Sorex* можно заметить, что *S. araneus* является внешней группой по отношению к остальным видам, что опять же соответствует общепринятой классификации, в которой этот вид относится к подроду *Sorex*, а остальные три вида относятся к подроду *Homalurus*, который в эволюционном ряду считается более продвинутым. Следуя выше сказанному, можно отметить, что на примере анализа исследуемых пяти видов представителей семейства Землеройковые, отчасти искусственная классическая система их классификации полностью соответствует системе построенной на основе молекулярных маркеров (*сyt b* мтДНК).

Оценка корреляции между матрицами генетических и прокрустовых дистанций на основании теста Мантела, позволяет отметить, что связь между матрицами достоверно низкая (999 повторов;  $p$ -value: 0.001; коэффициент корреляции – 0.39). Другими словами, дифференциация рассматриваемых групп по генетическим маркерам (мтДНК) не полностью совпала с морфологической дифференциацией (форма нижней челюсти).

### ВЫВОДЫ

Таким образом, исследование данной группы насекомоядных животных показало высокую роль адаптации в формировании краниометрических отличий. Сравнивая полученные данные с общепринятой таксономической классификацией, мы можем проследить их взаимосвязь только с дан-

ными молекулярно-генетического анализа. Исходя из этого, для построения схемы филогенетических связей более достоверным будет использование молекулярно-генетических данных.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Коллектив авторов выражает благодарность сотруднику ФГБУН Зоологического института РАН г. Санкт-Петербург Л.Л. Войта за ценные рекомендации и консультацию в ходе выполнения данной работы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 13-04-98823 и Правительства Республики Коми.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Млекопитающие Печоро-Ильчского заповедника. Сыктывкар, 2004. 464 с.
2. Павлинов И.Я. Анализ изменчивости верхних промежуточных зубов у землероек-бурозубок (*Sorex*) методами геометрической морфометрии. Зоологический журнал. 2004. Том. 83. № 7. С. 869–875.
3. Строганов С.У. Звери. Насекомоядные. М.: Изд-во АН СССР, 1957. 268 с.
4. Bromham L.D., Hendy M.D. Can fast early rates reconcile molecular dates to the Cambrian explosion? Proc. R.Soc. Lond. 2000. B. 267. P.1041–1047.
5. Castiglia R., Makundi, R. & Corti, M. The origin of an unusual sex chromosome constitution in *Acomys* sp. (Rodentia, Muridae) from Tanzania. Genetica. 2007. Vol. 131. P. 201–207.
6. Mantel N. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach // Cancer Research, 1967. Vol. 27. № 2. P. 209–220.
7. Ohdachi S.D., 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 // Molecular Ecology. 2001. Vol. 10. P. 2199–2213.
8. Omland K.E. 1997. Correlated rates of molecular and morphological evolution. Evolution Vol. 51. P. 1381–1393.
9. Tamura K., Dudley J., Nei M. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evolution. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
10. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D. and Fink W.L. Geometric morphometrics for Biologists: A Primer. Elsevier Academic Press. 2004. 437 p.

### ANALYSIS INTERSPECIES DIFFERENCES OF FIVE SPECIES OF SHREWS (LIPOTYPHLA: SORICIDAE): MORPHOMETRIC AND MOLECULAR DATA

© 2014 Dmitry M. Shadrin, Yana I. Pylina, Andrey N. Korolev

Institute of Biology of the Komi Science Centre of the Ural Division RAS

This article assesses the correlation of morphological (craniometrical) and genetic (mtDNA) interspecific variation of five species of Fam. Soricidae of the European North-East of Russia.

**Key words:** geometric morphometrics, molecular phylogeny, mtDNA, *Sorex minutus*, *S. caecutiens*, *S. isodon*, *S. araneus*, *Neomys fodiens*, Soricidae