

**Комарова Валерия Александровна**

**Микроэволюционные процессы на выраженном  
высотном градиенте в горных тропиках на примере  
крапчатых жестковолосых мышей**

*Lophuromys flavopunctatus* s. l.

**1.5.12 – Зоология**

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва – 2023**

Работа выполнена в Лаборатории микроэволюции млекопитающих Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук».

**Научный  
руководитель:**

*Лавренченко Леонид Александрович*

доктор биологических наук, заведующий лабораторией микроэволюции млекопитающих ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук»

**Официальные  
оппоненты:**

*Титов Сергей Витальевич*

доктор биологических наук, профессор, декан факультета физико-математических и естественных наук, заведующий кафедрой «Зоология и экология» ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет»

*Матророва Вера Анатольевна*

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории механизмов и контроля трансляции ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

**Ведущая  
организация:**

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук» (г. Москва)

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года в \_\_\_ часов \_\_\_ минут на заседании диссертационного совета 24.1.109.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук» по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33.  
Тел/факс: +7(495)952-35-84, e-mail: [admin@sevin.ru](mailto:admin@sevin.ru)

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: [www.sev-in.ru](http://www.sev-in.ru) и на сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу: [vak.minobrnauki.gov.ru](http://vak.minobrnauki.gov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Елена Александровна Кацман

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень изученности проблемы

Эфиопское нагорье (далее ЭН) является одним из наиболее важных центров биоразнообразия и эндемизма млекопитающих в Африке (Mittermeier et al., 2011). Благодаря уникальным климатическим особенностям, сложному горному рельефу, фрагментированному Рифтовой долиной и каньонами крупных речных долин, и, как следствие, высокому уровню эндемизма, территория ЭН предоставляет уникальные возможности для исследования различных микроэволюционных процессов в горных тропиках (Altshuler, 2006).

К настоящему времени, механизмы, ответственные за происхождение высокого видового разнообразия в горных тропиках, изучены недостаточно и могут быть сложнее, чем это предполагалось раньше. Поскольку Великая Рифтовая долина и глубокие речные каньоны представляют непреодолимые географические барьеры для потока генов между популяциями горных видов (например, растений – Mairal et al., 2017; амфибий – Evans et al., 2011; млекопитающих – Gottelli et al., 2004; Belay, Mori, 2006; Nicolas et al., 2008; Colangelo et al., 2013; птиц – Bowie et al., 2004), весьма вероятно, что современное видовое разнообразие Эфиопии возникло в результате аллопатрического видообразования. С другой стороны, разнообразие создаваемых стабильным тропическим климатом экологических ниш и возможность узкой специализации к ним отдельных видов создают предпосылки для градиентного (экологического) видообразования, при котором процессы диверсификации инициируются разнонаправленными экологически обусловленными силами отбора без прерывания потока генов между дивергирующими популяциями (Лавренченко, 2011; Nosil, 2012). Степень соответствия этой модели реальным природным ситуациям в горных тропиках остается пока дискуссионной (Лавренченко, 2011). Кроме этого, динамика границ высотных поясов растительности в плейстоцене также оказывала влияние на расселение и темпы видообразования различных групп мелких млекопитающих горной Африки, в частности ЭН. Это могло способствовать частичному перекрытию ареалов видов, адаптированных к различным участкам высотного градиента, и приводить к межвидовым контактам и гибридизации между популяциями, не полностью выработавшими надежные механизмы репродуктивной изоляции. Возможные свидетельства “древней” межвидовой гибридизации (интрогрессия “чужой” мтДНК) выявлены для некоторых групп мелких млекопитающих ЭН (Bryja et al., 2018; Bryja et al., 2019; Lavrenchenko et al., 2004).

Ряд особенностей экологии и распространения эфиопских представителей надвидового комплекса крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* sensu lato (s.l.) делает их подходящими модельными объектами для исследования различных микроэволюционных процессов на выраженном высотном градиенте. Так, некоторые из этих видов населяют экологически различающиеся пояса единого горного массива, что свидетельствует о выраженном характере их адаптации к достаточно узкому диапазону условий среды. Показано, что семь из девяти эфиопских видов обитают в условиях локальной симпатрии, в то время как все неэфиопские виды комплекса являются строго аллопатрическими (Lavrenchenko et al., 2007; Verheyen et al., 2007). Кроме этого, некоторые виды комплекса представляют собой уникальный пример множественной ретикулярной эволюции (Lavrenchenko et al., 2004, 2007). Первые свидетельства присутствия ретикулярных процессов в эволюции эфиопских видов *Lophuromys* – интрогрессия “чужеродной” мтДНК вследствие событий “древней” межвидовой гибридизации – показаны в работе Lavrenchenko et al. (2004). Стоит отметить, что это предположение было основано на данных по амплифицированной случайными праймерами полиморфной ДНК (RAPD-PCR), которые могут не подходить для филогенетических реконструкций (Lamboy, 1994), последовательностях двух митохондриальных генов, а также ограниченной выборке образцов, собранных в нескольких локальностях.

Для адекватного описания эволюционных историй, включающих как дивергентные, так и ретикулярные процессы, необходимо использование широкого набора данных по ядерному геному.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель работы:** реконструкция эволюционной истории эфиопских представителей надвидового комплекса крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l., выявление особенностей микроэволюционных процессов на выраженном высотном градиенте в горных тропиках. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Провести реконструкцию филогенетических взаимоотношений эфиопских представителей *Lophuromys flavopunctatus* s.l. на основе наборов митохондриальных и ядерных (включая данные ddRadSeq) маркеров.
- 2) Оценить времена дивергенции эфиопских видов комплекса, определить возраст предполагаемых событий древней гибридизации.
- 3) Провести детальный филогеографический анализ видов, предположительно вовлеченных в разновременные ретикулярные процессы.
- 4) Оценить степень возможной интрогрессии участков ядерного генома на основе данных ddRadSeq.
- 5) Провести реконструкцию дивергентных и ретикулярных процессов, определивших эволюционную историю надвидового комплекса крапчатых жестковолосых мышей.

### **Научная новизна**

Использование мультилокусного анализа и ddRAD-данных позволило получить окончательно разрешенную филогению эфиопских видов комплекса *Lophuromys flavopunctatus* s.l. и пролить свет на филогенетические взаимоотношения между ними. Впервые получены последовательности полных митохондриальных геномов эфиопских *Lophuromys* (Komarova et al., 2022), послужившие основой для детального анализа их филогенетической структуры. Подтверждена гипотеза о множественной ретикуляции, включающей предполагаемые события как “современной”, так и “древней” интрогрессии мтДНК, среди некоторых видов эфиопских *Lophuromys*, населяющих крайне ограниченные территории.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в нашем исследовании результаты вносят вклад в эволюционную биологию, способствуя лучшему пониманию механизмов формирования и поддержания современного биологического разнообразия, большая часть которого сконцентрирована в горных тропиках. Применение различных методов при исследовании филогенетических взаимоотношений видов крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l. позволяет апробировать данный комплексный подход и при изучении других групп мелких млекопитающих, населяющих горные тропики.

Проведенное исследование имеет потенциальное природоохранное значение. Несмотря на то, что часть ареалов исследованных видов расположена на территориях Национальных Парков, их местообитания находятся под угрозой исчезновения как за пределами, так и внутри охраняемых территорий из-за чрезмерного выпаса скота, пожаров и вырубки лесов. Кроме того, некоторые из исследованных видов являются малочисленными эндемиками (*L. menageshae*, *L. chercherensis*, *L. pseudosikapusi*) или занимают ограниченные участки афроальпийских местообитаний (*L. melanonyx*), в связи с чем подлежат особой охране.

Полученные результаты вносят вклад в понимание общих процессов адаптации млекопитающих к условиям высокогорья и могут иметь определенное медицинское значение.

Материалы исследования могут быть использованы при подготовке лекций по зоологии, генетике и эволюционной биологии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1) Выявленные случаи несогласованности результатов реконструкции митохондриальной и ядерной филогении эфиопских *Lophuromys* объясняются одновременными процессами гибридизации и последующей интрогрессии мтДНК.

2) Установлена исходная видоспецифичность митохондриальных геномов для трех видов (*L. melanopus*, *L. menageshae* и *L. simensis*), предположительно вовлеченных в процессы древней межвидовой гибридизации.

3) Генетическое и видовое разнообразие эфиопских *Lophuromys* сформировалось в результате «многослойного» сочетания дивергентных и ретикулярных процессов.

### **Личный вклад автора**

Автор лично принимала участие в сборе материала в составе териологического отряда Совместной Российско-Эфиопской Биологической Экспедиции (СРЭБЭ) в Национальном Парке Чебера Чурчур (2020 г.), расположенном в бассейне реки Омо. В ходе данной экспедиции был собран обширный материал по мелким млекопитающим, в том числе по представителям избранной группы. Лабораторная обработка материала (собранного в 1995 – 2020 гг.) с использованием современных молекулярно-генетических методов (пробоподготовка образцов для секвенирования по Сэнгеру и получение полных митогеномов) и филогенетический анализ полученных результатов были выполнены автором лично на базе Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН. Пробоподготовка библиотек для высокопроизводительного секвенирования методом ddRad и последующий анализ результатов выполнены при активном участии автора на базе Института биологии позвоночных Академии Наук Чешской Республики (Чехия, Брно). Написание всех разделов диссертации полностью выполнено автором, вклад автора в подготовку диссертации составил не менее 95%. Все опубликованные по теме диссертации статьи подготовлены и написаны при непосредственном участии автора.

### **Достоверность и апробация результатов работы**

Достоверность результатов исследования обеспечивается использованием проверенных общепринятых методик полевого сбора материалов и анализа данных, опубликованных в международных научных рецензируемых журналах, а также сертифицированного оборудования. Опубликованные по теме диссертации статьи прошли экспертную проверку ведущими отечественными и зарубежными специалистами в области зоологии и эволюционной биологии. Основные результаты диссертации были представлены на международной конференции по мелким млекопитающим Африки «The 13th African Small Mammal Symposium» (г. Мекеле, Эфиопия, 16 – 21 сентября 2019 г.); международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2021» (г. Москва, Россия, МГУ им. М. В. Ломоносова, 12 – 23 апреля 2021 г.); XI съезде териологического общества при РАН «Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии» (г. Москва, Россия, 14 – 18 марта 2022 г., ИПЭЭ им. А. Н. Северцова РАН); IV-ой международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (г. Москва, Россия, Государственный Дарвиновский музей; 17 – 20 октября 2022 г.).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них статей в журналах из списка ВАК РФ и в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science — 6.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 234 страницах текста и состоит из Аннотации, Введения, 5 глав основной части (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение), Выводов, Благодарностей, Списка публикаций автора по теме диссертации, Списка цитируемой литературы, включающего 434 источника, и Приложения. Проиллюстрирована 16 рисунками и 6 таблицами в основном тексте, 4 рисунками и 4 таблицами в приложении.

## **Благодарности**

Я бесконечно признательна своему научному руководителю д.б.н. **Лавренченко Л. А.**, за наставничество и всестороннее руководство моей работой с университета, за проявленное терпение и моральную поддержку на всех этапах выполнения данного исследования. Я очень признательна членам териологического отряда СРЭБЭ **Мартынову А. А.**, **Громову А. Р.**, к.б.н. **Александрову Д. Ю.**, к.б.н. **Костину Д. С.** за сбор материала, послужившего основой для данного исследования. Также хочется выразить благодарность коллегам из Института биологии позвоночных (Брно, Чехия) за предоставленные материалы и многолетнее плодотворное сотрудничество, благодаря которому данная работа стала возможной. В особенности хочу поблагодарить своего коллегу **Костина Д. С.** за неоценимую помощь в освоении методов молекулярной генетики и филогенетического анализа, использованных в работе. Я искренне признательна **Лебедеву В. С.** (Зоологический музей МГУ) за ценные рекомендации и советы на всех этапах проведения исследования. Выражаю отдельную благодарность всему коллективу лаборатории микроэволюции млекопитающих ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН за постоянную поддержку и неравнодушное отношение при выполнении этого исследования.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проекты № 20-34-90032\_аспиранты, 18-04-00563-а, 19-54-26003\_Чехия-а).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Во **ВВЕДЕНИИ** обоснованы актуальность и степень изученности избранной темы, определены цели и задачи исследования, приведены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и основные положения, выносимые на защиту.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1. Древо жизни: всегда ли расходятся виды?** Дан краткий обзор становления и развития эволюционной концепции древа жизни, иллюстрирующий, что обмен генами между ветвями “эволюционного древа” происходил у всех форм жизни в течение эволюции гораздо чаще, нежели это предполагали ранее. С появлением свидетельств наличия ретикулярных процессов в природе, включающих в себя горизонтальный перенос генов и гибридизацию, стало очевидно, что механизмы репродуктивной изоляции не абсолютны даже у растений и многоклеточных животных (Arnold, 2006; Toews, Brelsford, 2012). Биологическая эволюция скорее напоминает запутанную сеть, нежели дихотомически ветвящееся филогенетическое древо жизни. Значительная часть раздела посвящена межвидовой гибридизации — процессу обмена генами при скрещивании генетически отдаленных популяций близкородственных видов. Кратко рассмотрены механизмы и возможные эволюционные последствия межвидовой гибридизации, в частности, процесс интрогрессии, с помощью которого разные виды

приобретают общие гены в результате возвратного скрещивания (Anderson, 1949; Rhymer, Simberloff, 1996). Особое внимание уделено роли этих процессов в эволюции млекопитающих.

**1.2. Значение горных тропиков для микроэволюционных исследований.** Дана физико-географическая характеристика Эфиопии. Кратко описаны ее геологическая история, геоморфологические и климатические особенности. Большую часть территории страны занимает самый обширный горный массив Африки — ЭН (средняя высота около 2200 м над ур. моря; Yalden, 1983), возникшее в результате отложений вулканических базальтовых извержений с середины эоцена до плиоцена (Ebinger, Sleep, 1998). Наиболее заметной геоморфологической особенностью ЭН является простирающаяся на 500 км Эфиопская рифтовая долина — обширный тектонический разлом, пересекающий горные массивы на два неравных изолированных блока — основное северо-западное (Абиссинское) и, меньшее по площади, юго-восточное (Сомалийское) плато (Bonini et al., 2005). Возникновение рифта, образовавшегося в результате спрединга Африканской и Аравийской литосферных плит, относят к началу миоцена (20 — 13 млн. лет назад). Северо-западное плато имеет многоступенчатый рельеф, фрагментированный каньонами речных долин (Текезе, Голубой Нил и Омо), и включающий ряд горных массивов, самый крупный из которых представляет собой старейший в стране щитовой вулкан — Симиен с высочайшей вершиной Рас-Дашен (4623 м). В северо-западной части ЭН находится крупнейший на континенте каньон — долина Голубого Нила. Меньшее по площади Сомалийское плато представлено отдельными горными массивами, самый обширный из которых — Бале — единственный щитовой вулкан. Занимающее центральную часть массива Санетти плато (средняя высота — 4050 м) представляет собой самый обширный комплекс афро-альпийских местообитаний в стране. Положение Эфиопии в субэкваториальном поясе и характер осадков нивелируют сезонные перепады температур, что определяет их постоянство в течение всего года (Janzen, 1967). Горный характер страны и климатические условия определяют четко выраженную поясность, характеризующуюся высотным распределением разных типов растительности и, как следствие, большим разнообразием экологических ниш. С увеличением высоты последовательно замещают друг друга горные тропические леса, верещатники и зона афро-альпийской растительности.

Уникальное разнообразие ландшафтов и выраженный высотный градиент природных условий обуславливают высокий уровень биоразнообразия и эндемизма на ЭН, что характеризует данный регион как удобный полигон для микроэволюционных исследований.

**1.3. Общая характеристика крапчатых жестковолосых мышей надвидового комплекса *Lophuromys flavopunctatus* s.l.** Приведены сведения о систематическом положении и видовом составе данного комплекса. В составе подрода жестковолосых мышей *Lophuromys* (род *Lophuromys*, сем. Muridae, подсем. Deomyinae) выделяют три надвидовых комплекса — *L. nudicaudus* s.l., *L. sikapusi* s.l. и *L. flavopunctatus* s.l. (Verheyen et al., 2002; Wilson et al., 2017). На данный момент надвидовой комплекс *L. flavopunctatus* s.l. включает 21 вид, широко распространенных в различных местообитаниях на территории всей тропической Африки (Bryja et al., 2019; Onditi et al., 2021). Согласно ранним таксономическим ревизиям грызунов, считалось, что на территории Эфиопии обитают только два вида этого комплекса — широко распространенный и полиморфный *L. flavopunctatus* и афро-альпийский *L. melanonyx* (Yalden et al., 1976, 1996). Последующие молекулярно-генетические, цитогенетические и морфологические исследования пролили свет на видовое разнообразие эфиопских *Lophuromys* (Lavrenchenko et al., 1998, 2001, 2004, 2007). В настоящее время признано существование девяти видов *Lophuromys*, эндемичных для территории ЭН (Рис. 9) и хорошо различимых между собой по ряду признаков (Bryja et al., 2019; см. табл. 1). Их распространение изолировано от ареалов остальных видов данного комплекса непригодными для обитания аридными территориями (Verheyen et al., 2002).

Подробно рассмотрены морфологические характеристики, особенности экологии и распространения, а также ранее известные аспекты филогении эфиопских видов этого

комплекса, как подходящих модельных объектов для исследования различных микроэволюционных процессов на выраженном высотном градиенте природных условий.

Таблица 1. Характеристика эфиопских *Lophuromys* с учетом данных нашего исследования.

Вид	Распространение	Высотные диапазоны (м над ур. м.)
<i>L. chrysopus</i> (Osgood, 1936)	горные тропические леса северо-западного и юго-восточного плато	1200 – 3119
<i>L. melanonyx</i> (Petter, 1972)	афро-альпийские местообитания юго-восточного и северо-западного (для генетически неподтвержденных образцов) плато	3100 – 4110
<i>L. brevicaudus</i> (Osgood, 1936)	вересковые пустоши юго-восточного и северо-западного (для генетически неподтвержденных образцов) плато.	2400 – 3811
<i>L. flavopunctatus</i> (Thomas, 1888)	горный тропический лес Менагеша и граница вересковых пустошей и афро-альпийской зоны в Дебре-Сине и Гуассе (северо-западное плато)	2600 – 3320
<i>L. brunneus</i> (Thomas, 1906)	горные тропические леса северо-западного плато	1427 – 2800
<i>L. chercherensis</i> (Lavrenchenko et al., 2007)	горные тропические леса Черчерских гор (юго-восточное плато)	2000 – 2767
<i>L. pseudosikapusi</i> (Lavrenchenko et al., 2007)	юго-западные вечнозеленые леса северо-западного плато	1440 – 1996
<i>L. menageshae</i> (Lavrenchenko et al., 2007)	лес Менагеша (северо-западное плато)	2100 – 2600
<i>L. simensis</i> (Osgood, 1936)	вересковые пустоши и афро-альпийская зона северо-западного плато	1800 – 3965

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**2.1. Сбор материала в полевых условиях.** Материал собран в рамках работы Совместной Российско-Эфиопской Биологической Экспедиции (СРЭБЭ) в период 1995 – 2020 гг., а также научно-исследовательских проектов Института биологии позвоночных Академии Наук Чешской Республики (Брно, Чехия) в 2012 – 2018 гг. В работе были использованы пробы тканей 322 экземпляров эфиопских *Lophuromys* из 26 локалитетов, охватывающих ареалы распространения девяти известных видов (Рис. 1). Приводится краткое описание используемых методов отлова мелких млекопитающих и получения проб тканей.

**2.2. Выделение ДНК, амплификация и секвенирование митохондриальных и ядерных генов по Сэнгеру.** Пробоподготовка для молекулярно-генетического анализа выполнена на базе лаборатории микроэволюции млекопитающих ИПЭЭ им. А. Н. Северцова РАН. Выделение геномной ДНК из образцов тканей (мышцы, сердце, почки и печень) проводили методом фенол-хлороформной экстракции (Sambrook et al., 1989) и коммерческими наборами (ДНК-Экстран-2).



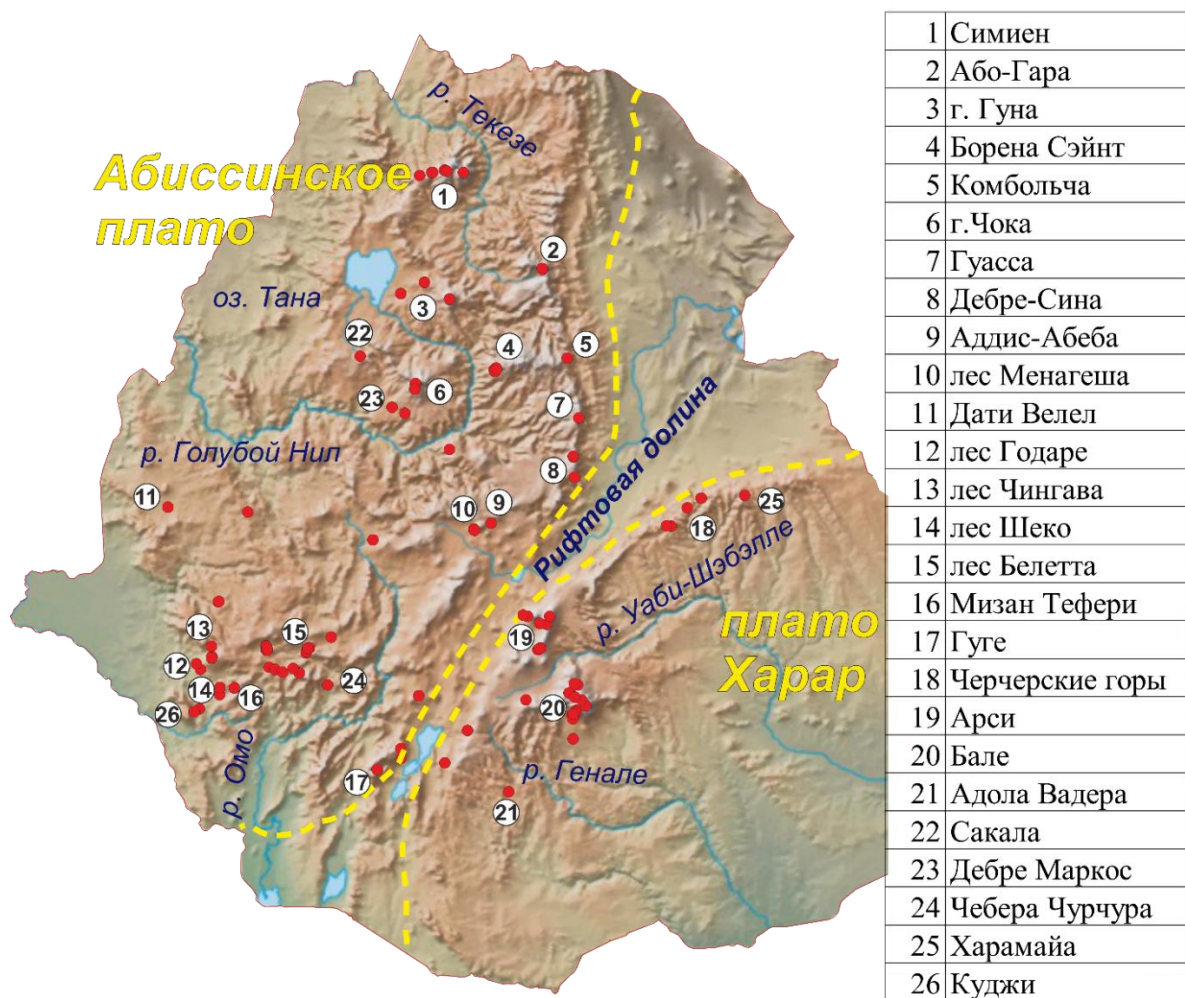


Рисунок 1. Карта локалитетов сбора материала, охватывающего все известные ареалы распространения девяти видов эфиопских *Lophuromys* (красные кружки).

Для филогенетического анализа были выбраны последовательности митохондриального гена *CYTB* и четырех ядерных маркеров (двух интронов – *WLS-7*, *DHCR24-7* и двух экзонов – *IRBP*, *GHR*). Из 17 используемых праймеров для амплификации целевых фрагментов 8 были подобраны в рамках данного исследования, остальные 9 взяты из статей Stanhope et al. (1992), Adkins et al. (2001), Poux, Douzery (2004), Лавренченко, Верхейен (2006), Rodríguez-Prieto et al. (2014). Оптимизация условий ПЦР амплификации проводилась для каждой пары “праймер-матрица”. Приводится подробное описание этапов пробоподготовки и детальная характеристика используемых маркеров, комбинаций праймеров и протоколов ПЦР-реакций. Услуги по секвенированию полученных продуктов амплификации были предоставлены компанией “Евроген” (г. Москва).

**2.3. Подготовка библиотек случайных фрагментов методом ddRAD.** Получение SNP-маркеров ядерного генома 209 экземпляров эфиопских *Lophuromys* произведено методом ddRAD (Peterson, et al., 2012). Пробоподготовка библиотек выполнена на базе молекулярной лаборатории Института биологии позвоночных Академии Наук Чешской Республики (Брно, Чехия). Для этого использована комбинация традиционного подхода по Peterson et al. (2012) и подхода 2RAD, описанного Bayona-Vásquez et al. (2019). Детально рассмотрены все этапы подготовки библиотек (выделение ДНК, фрагментация ДНК рестриктазами, лигация адаптеров и присоединение индексов методом ПЦР), приведены характеристики используемых адаптеров и праймеров. Услуги по секвенированию библиотек были предоставлены компанией Genomics Core Facility (CEITEC; г. Брно). Поиск и сборка SNPs de novo проведены на интерактивной платформе iPyrad (Eaton, Overcast, 2020). Финальный набор данных включал 71 341 SNP маркеров. Файлы FASTQ от всех образцов, использованных в

окончательном анализе, были загружены в Dryad и доступны по ссылке <https://doi.org/10.5061/dryad.stjq2c2r>.

**2.4. Проведение филогенетического анализа и построение медианной сети гаплотипов на основе последовательности гена *CYTB*.** Выравнивание и обработку полученных последовательностей гена *CYTB* длиной 1140 п.н. и отдельных ядерных маркеров производили в программах Lasergene SeqMan Pro v. 7.1.0 (Burland, 1999) и Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Разбиение полных последовательностей гена *CYTB* на предполагаемые “кандидатные” виды производилось с использованием алгоритма Automatic Barcoding Gap Discovery Method (ABGD; Puillandre et al., 2011). Финальный филогенетический анализ проводился на репрезентативной выборке последовательностей гена *CYTB* 121 экземпляра эфиопских *Lophuromys* при помощи подходов байесовского анализа (BI) и максимального правдоподобия (ML). Филогенетический ML анализ был выполнен в программе RAxML v.8.2.10 (Stamatakis, 2014), BI алгоритм — в программе MrBayes 3.2.6 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Поиск оптимальной схемы разбиения на филогенетические партии и оптимальных моделей скорости нуклеотидных замен выполнен с использованием программы PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear et al., 2016). В качестве внешней группы были взяты последовательности *L. nudicaudus*. Средние генетические *r*-дистанции как между митохондриальными линиями, так и внутри каждой из них, вычислены в программе MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016). Построение медианной сети гаплотипов на основе выравнивания длиной 685 п. н. 200 образцов эфиопских *Lophuromys* было проведено в программе PopART v.1.7 (Leigh, Bryant, 2015).

**2.5. Анализ ядерных маркеров.** Объединение наборов данных по четырем отдельным ядерным маркерам 54 особей эфиопских *Lophuromys* (всего 2409 п. н.) проведено с использованием программы Sequence Matrix 1.7.8. (Vaidya et al., 2011). Филогенетический анализ на основе полученного выравнивания производился с использованием BI и ML подходов по принципу анализа мтДНК (см. выше). В качестве внешней группы использованы последовательности *L. ansorgei*. Анализ разграничения видов (species delimitation) на основе отдельных ядерных генов производился с использованием пакета STACEY (Jones, 2017), реализованного в программе BEAST 2.4.7 (Drummond, Bouckaert, 2015).

ML филогения 209 экземпляров на основе SNPs, полученных методом ddRAD, реконструирована в программе RAxML v.8.2.10 (Stamatakis, 2014). Проведены альтернативные ML анализы для наборов данных, содержащих 71 341 SNP (для всей выборки образцов), 699 SNP (присутствующих у 90% образцов) и 13 184 SNP (у 30% образцов). В качестве внешней группы использованы последовательности *L. ansorgei* и *L. angolensis*. Анализ разграничения видов производился с использованием методов обрезки ветвей (branch-cutting; Mikula, 2018) и высокоскоростного mPTP (Kapli et al., 2017). Оценка структуры популяций по данным ddRAD выполнена при помощи sNMF метода (Frichot et al., 2014) с использованием пакета LEA (Frichot, François, 2015) в среде R.

Финальное видовое дерево на основе четырех ядерных маркеров построено в программе \*BEAST v2.4.7 (Drummond, Bouckaert, 2015). Отнесение исследуемых экземпляров к предполагаемым “кандидатным” видам выполнено в соответствии с результатами анализов, описанных выше в данной главе.

Молекулярное датирование узлов дивергенции между видами эфиопских *Lophuromys* на основе четырех ядерных маркеров выполнено в программе \*BEAST v2.4.7 с параметрами, описанным для видового дерева. Поскольку представители рода *Lophuromys* отсутствуют в палеонтологической летописи (Turner et al., 1999), нами была выполнена вторичная калибровка с использованием возраста дивергенции надвидовых комплексов *L. sikapusi* s.l. и *L. flavopunctatus* s.l. (Aghová et al., 2018). Оценка времен предполагаемых событий древней гибридизации произведена на основе гена *CYTB* тех же 54 экземпляров эфиопских *Lophuromys* аналогичным образом. Визуализация полученных данных была выполнена с использованием R-пакета STRAP (Bell, Lloyd, 2015) в среде R.

Оценка степени ядерной интрогрессии между видами эфиопских *Lophuromys*, предположительно вовлеченными в разновременные события гибридизации, выполнена на

основе SNP данных при помощи ABBA-BABA теста (Green et al., 2010; Durant et al., 2011), различающего паттерны интрогрессии от таковых анцестрального полиморфизма и последующей неполной сортировкой линий.

**2.6. Получение и анализ полных митохондриальных геномов.** Пробоподготовка библиотек для получения полных митохондриальных геномов 40 экземпляров эфиопских *Lophuromys* выполнена на базе лаборатории микроэволюции млекопитающих ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Обогащение библиотеки митохондриальной фракцией проводилось путем получения трех перекрывающихся фрагментов для каждого образца методом Long Range PCR (Davies, Gray, 2002; Nicolas et al., 2020). Полировка тупых концов и парное лигирование было произведено набором NEBNext Ultra II (NEB, E7645S), амплификация каждого образца – набором NEBNext для мультиплексирования библиотек с комплектом дважды индексированных праймеров (NEB, E7780S). Далее детально рассмотрены все этапы подготовки библиотек (выделение ДНК, фрагментация ДНК ультразвуком, лигирование адаптеров и присоединение индексов методом ПЦР).

Сборка de novo полных митогеномов была осуществлена программой GetOrganelle v1.7.6.1 (Jin et al., 2020). Аннотация полученных последовательностей была выполнена с использованием программы MitoZ (Meng et al., 2019). Множественное выравнивание выполнено алгоритмом MAFFT v.7.308 в программе Unipro UGENE (Rose et al., 2018).

Извлеченные из полных митогеномов белок-кодирующие (13 PCGs) и рНК (2 ррНК и 22 трНК) гены были объединены в общее выравнивание длиной 15 454 п.н. Некодирующий контрольный регион D-петля (Nicholls, Minczuk, 2014) был исключен из дальнейшего анализа ввиду высокой изменчивости. Филогенетический анализ проводился на основе объединенных последовательностей 37 митохондриальных генов с использованием BI и ML подходов по принципу анализа для мтДНК (см. выше). В качестве внешней группы была использована извлеченная из Ген Банка последовательность митохондриального генома *Deomys ferrugineus* (MZ159975.1).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Разнообразие и распространение основных митохондриальных линий.

Филогенетический анализ полных последовательностей *CYTB* (1140 п.н.) BI и ML подходами выявил идентичные топологии деревьев с хорошим разрешением (Рис. 2), соответствующие результатам предыдущих исследований данной группы (Lavrenchenko et al., 2004). Наряду с анализом разнообразия гаплотипов (Рис. 3а) определены 12 основных линий мтДНК, соответствующие девяти видам эфиопских *Lophuromys*, хорошо распознаваемых по ряду морфологических и кариологических признаков (Рис. 2, “species”). Подход ABGD выделил 10 линий мтДНК, объединив ‘simensis north I’ и ‘simensis north II’ с одной стороны и ‘brunneus I’ и ‘flavorpunctatus’ с другой (Рис. 2, “ABGD”).

Три из девяти признанных видов обладают двумя реципрокно не монофилетичными линиями мтДНК: *L. melanonyx* (‘melanonyx I’ и ‘melanonyx II’; р-дистанция –  $5,7 \pm 0,68\%$ ), *L. simensis* (‘simensis north I’ и ‘simensis north II’; р-дистанция –  $5,6 \pm 0,68\%$ ) и *L. brunneus* (‘brunneus I’ и ‘brunneus II’; р-дистанция –  $4,5 \pm 0,6\%$ ). Эволюционные р-дистанции между отдаленными гаплогруппами каждого из трех видов сравнимы с межвидовыми дистанциями. Вторая гаплогруппа у *L. melanonyx* и *L. simensis* (‘melanonyx II’ и ‘simensis north II’ соответственно) образует общую кладу с гаплогруппой ‘menageshae’, соответствующей обитателю горного тропического леса *L. menageshae* (р-дистанции составляют 2,5 % и 2,2% соответственно). В популяциях *L. brunneus* вторая линия (‘brunneus II’) образует общую кладу с гаплогруппой ‘flavorpunctatus’ (р-дистанция – 1,8%).

Две дивергировавшие линии мтДНК в популяциях каждого из трех видов в целом распространены парапатрично за некоторыми исключениями (*L. melanonyx* в горах Арси, *L. simensis* на восточном берегу оз. Тана и *L. brunneus* в нескольких лесах юго-запада Эфиопии; Рис. 3б-д). Кроме этого, мы обнаружили два случая предполагаемой “недавней” интрогрессии

мтДНК (отмечены красными стрелками на рисунках 2 и 3г,д и красными рамками на рисунке 3а): все особи *L. simensis* из Борена Сэйт и Комбольчи несут мтДНК, практически полностью совпадающую с таковой у *L. menageshae*; у некоторых особей *L. brunneus* из леса Белетта было обнаружено наличие одного и того же гаплотипа мтДНК, принадлежащего линии 'flavopunctatus'. Анализ медианной сети гаплотипов показал хорошо выраженную филогеографическую структуру для *L. chrysopus* (с гаплогруппой мтДНК 'chrysopus') с разделением на две группы, которые соответствуют популяциям к востоку и западу от Рифтовой долины (Рис. 3а). При этом, гаплотип (H\_65) западной клады из леса Белетта (северо-западное плато ЭН) занимает отдаленное положение на филогенетической сети и относится скорее к восточной гаплогруппе, хотя он может представлять собой самостоятельную гаплогруппу с плохим разрешением (Рис. 3а).

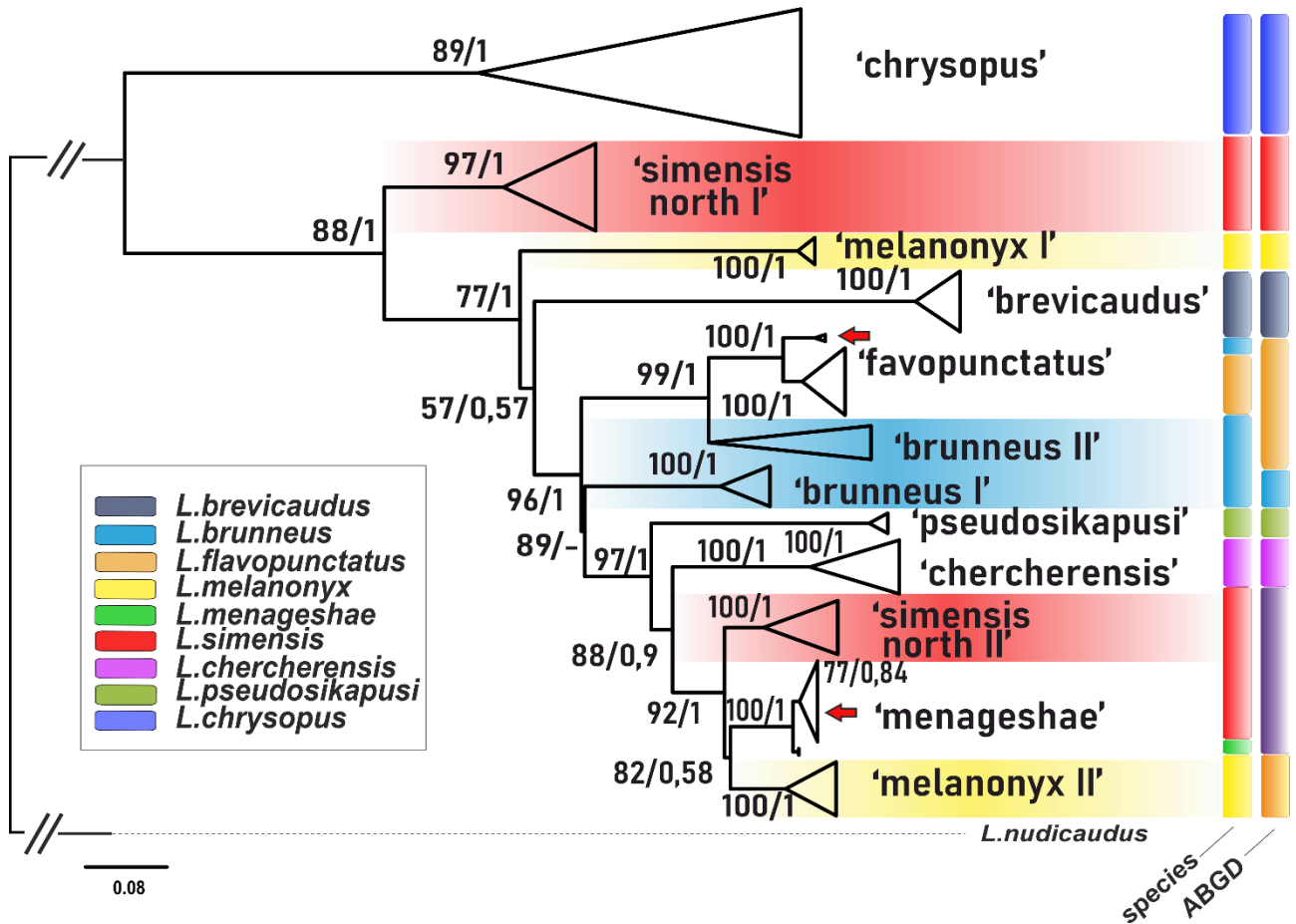


Рисунок 2. Филогенетическое ML дерево эфиопских *Lorhynchotus* на основе гена *CYTB*. Цифрами над узлами обозначены бутстреп поддержки ML / апостериорные вероятности VI. Цветные заливки показывают по две глубоко дивергировавшие митохондриальные линии для *L. melanonyx* (желтый), *L. simensis* (красный) и *L. brunneus* (голубой). Первый ряд вертикальных прямоугольников обозначает соответствие каждой линии одному из девяти видов эфиопских *Lorhynchotus* (см. легенду в левой части рисунка), разграниченных на основе цитологического и морфологического анализов, а также ядерных маркеров. Красные стрелки указывают на популяции *L. brunneus* и *L. simensis*, вовлеченных в предполагаемые события недавней интрогрессии мтДНК (подробности в тексте). Второй ряд вертикальных прямоугольников представляет собой анализ разграничения "видов" с помощью подхода ABGD.



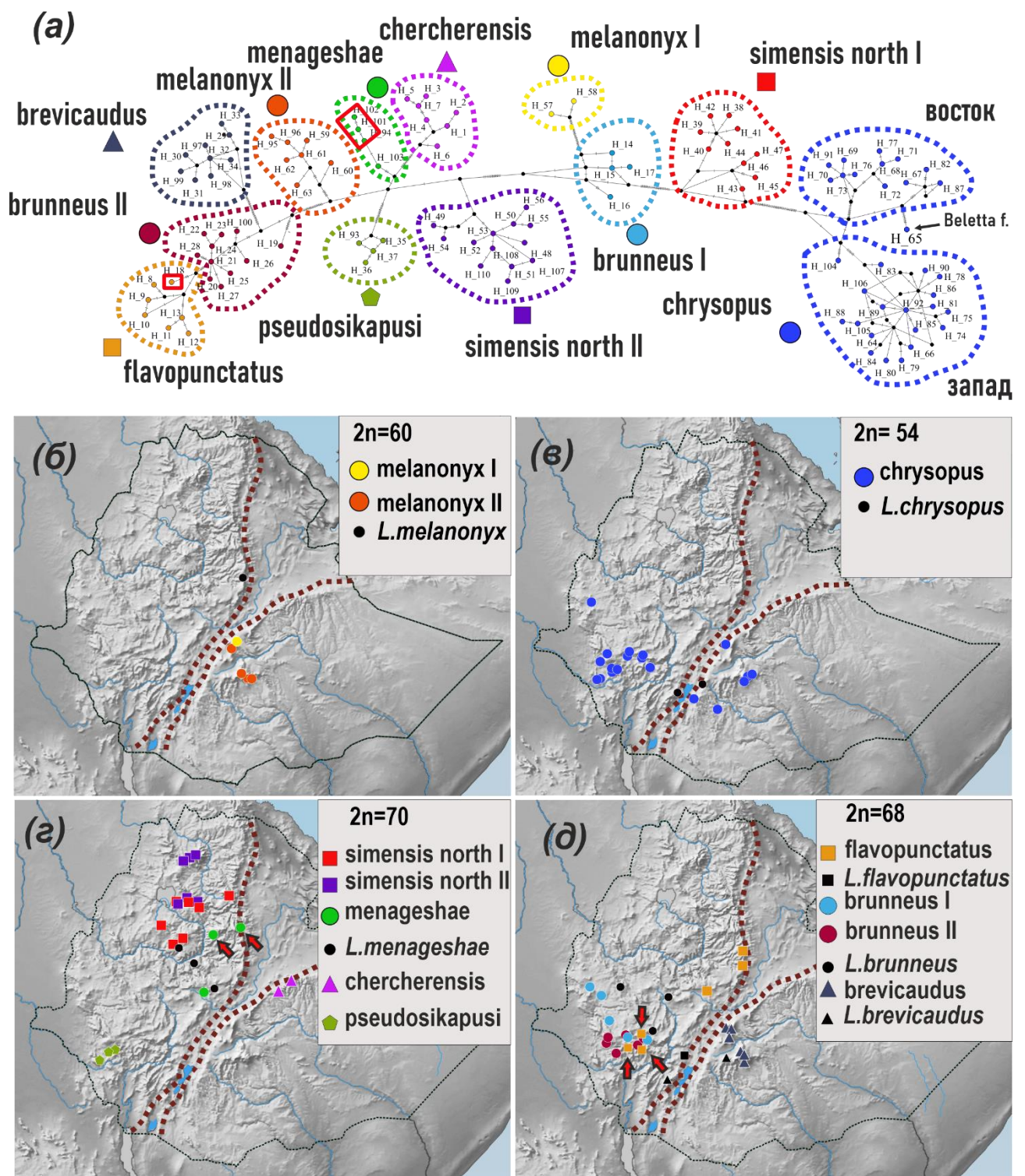


Рисунок 3. Медианная сеть гаплотипов эфиопских *Lophiopus*, построенная на основе изменчивости последовательностей гена *CYTB* (а). Засечки на сети соответствуют одному мутационному событию. Фигуры разного цвета маркируют гаплогруппы в соответствии с их географическим распространением на картах б-д. Красными рамками обозначены гаплотипы мтДНК, недавно интрогрессированные в популяции других видов (подробности см. в тексте). Карты б-д показывают географическое распространение 12 основных митохондриальных линий, разграниченных на рисунках 2 и 3а. Красные стрелки указывают на популяции соответствующих видов, вовлеченных в предполагаемые события недавней интрогрессии мтДНК. Символы разного цвета представляют генетические данные, черные символы обозначают генетически неподтвержденные образцы эфиопских *Lophiopus*, видовой принадлежности которых основана только на морфологическом анализе (по литературным данным).

Филогенетические BI и ML реконструкции на основе полных митохондриальных геномов практически не отличаются от таковых на основе последовательностей *CYTB* от расширенной выборки экземпляров (Рис. 4). Обнаруженное несоответствие филогении, по всей видимости, является артефактом второго из этих анализов, возникающим вследствие недостаточности филогенетического сигнала для разрешения отдельных ветвей.

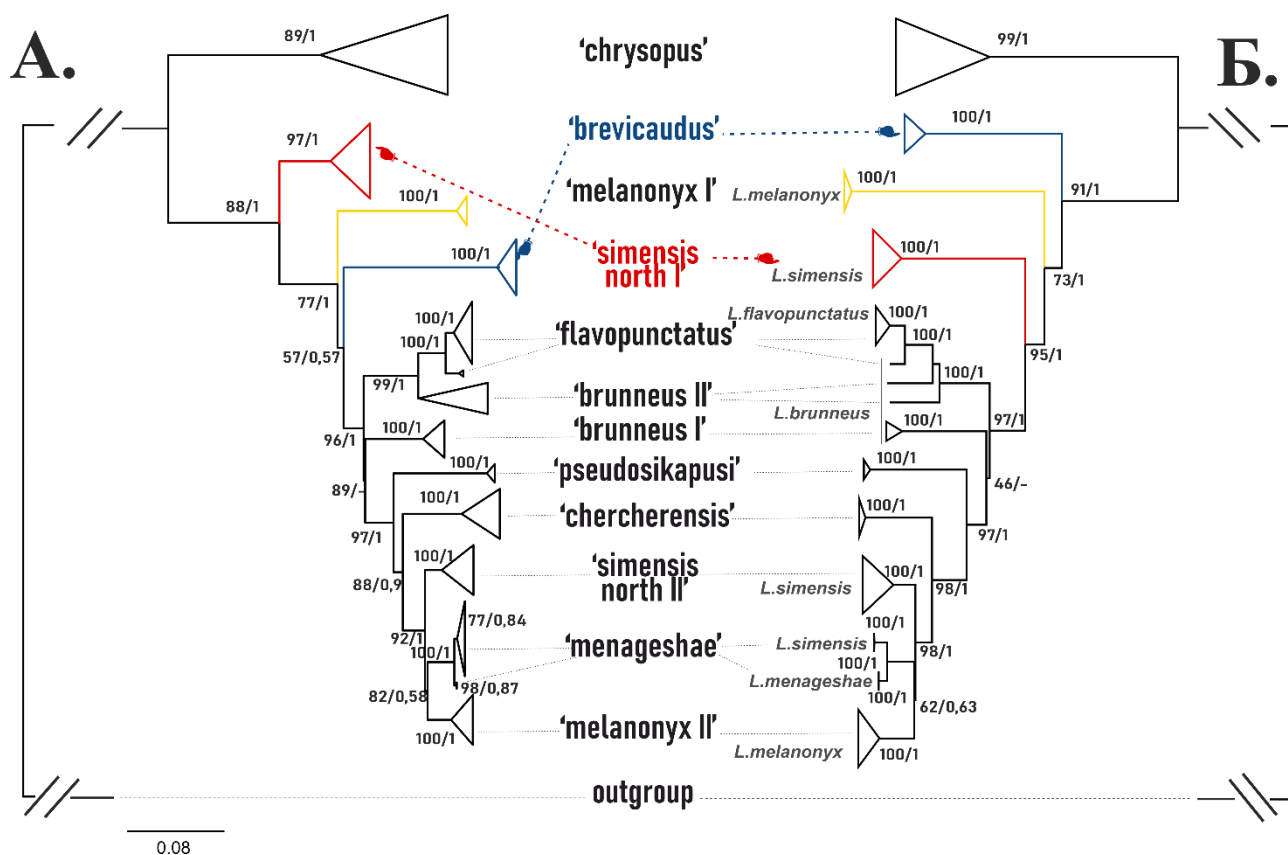


Рисунок 4. Сравнение филогенетических реконструкций эфиопских *Lophuromys*, построенных на основе последовательностей гена *CYTB* (А) и объединенных последовательностей 37 генов (13 белок-кодирующих PCGs, 2 рРНК и 22 тРНК) мтДНК (Б). Цифрами над узлами обозначены бутстреп поддержки ML и апостериорные вероятности BI анализов.

**3.2. Филогенетическая структура эфиопских *Lophuromys* на основе ядерных маркеров и методов разграничения видов.** Филогенетическая ML реконструкция конкатенированных SNPs данных (71 341 SNP; Рис. 5а) показала четкую филогенетическую структуру с разбиением на 9 основных филогенетических линий, соответствующих девяти эфиопским видам *Lophuromys*. Полученная топология разделяет виды на четыре монофилетические клады с одинаковым диплоидным набором хромосом, что согласуется с ранее известными данными. ML анализ с использованием альтернативных наборов ddRAD данных с уменьшенным количеством отсутствующей информации показал сходные результаты (не показано). Филогенетические ML и BI реконструкции на основе единого выравнивания последовательностей четырех ядерных маркеров (54 экземпляра эфиопских *Lophuromys*) показали идентичные результаты, однако с более низким разрешением (результаты не приведены).

На филогенетических ddRad реконструкциях для некоторых видов также прослеживается филогеографическая структура. Так, для *L. melanonyx* показано разделение на популяции гор Бале и Арси, а для *L. simensis* – разделение популяций горы Чока и ее окрестностей от остальных локальностей (Рис. 5 а, в, г).

Выявлены значительные разногласия между филогенетическими реконструкциями на основе мтДНК и ядерных маркеров (включая данные ddRad), выражающиеся в несоответствии между отдельными линиями мтДНК и ddRad-кладами трех полиморфных по мтДНК видов (*L.*

*brunneus*, *L. melanonyx* и *L. simensis*). Популяции с дивергировавшими линиями мтДНК в пределах каждого из этих трех видов показывают гомогенность по ядерному геному (Рис. 5б-г).

Разграничение видовых границ для ddRAD дерева показало разделение, в одном случае, на девять (Рис. 5а, “branch-cut”), в другом, на одиннадцать (Рис. 5а, “mPTR”) предполагаемых видов. Во втором случае, деление отражает выраженные филогеографические группировки в популяциях *L. simensis* и *L. melanonyx*. Разграничение видов в STACEY по данным четырех ядерных маркеров (Рис. 5а, “STACEY”) согласуется с результатами использования метода “обрезки ветвей” (“branch-cut”), за исключением слияния линий ‘chercherensis’ и ‘pseudosikapusi’ в единый вид по ядерному геному. Тем не менее, выраженные различия *L. chercherensis* и *L. pseudosikapusi* по краниальной морфологии (Lavrenchenko et al., 2007) подтверждают их принадлежность к разным видам.

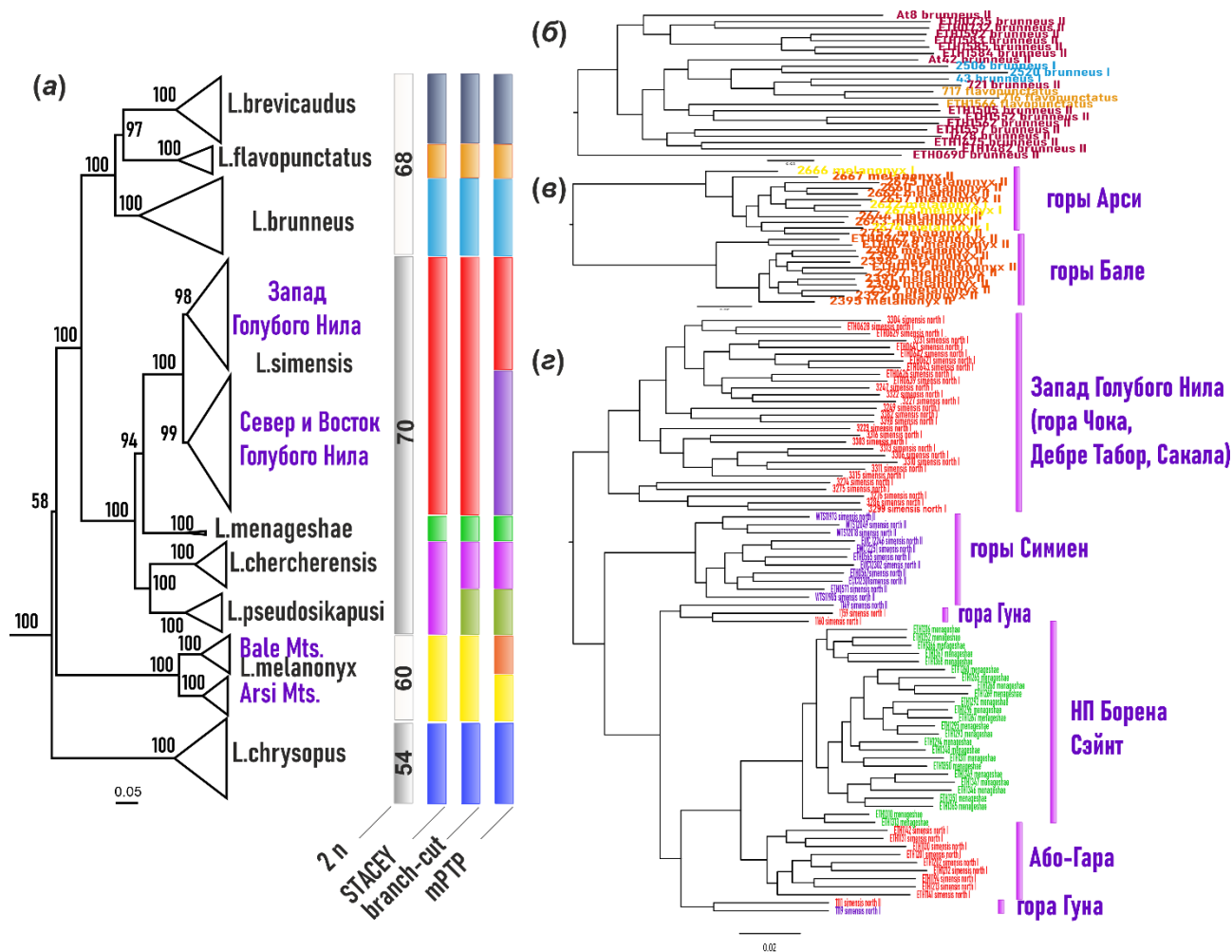


Рисунок 5. (а) Топология ML дерева, на основе конкатенированных SNPs данных (71 341 SNP) 209 экземпляров эфиопских *Lophiomyes*. Цифры в узлах обозначают бутстреп поддержки ML-анализа. Ряды вертикальных прямоугольников представляют собой соответствия клад хромосомным данным (‘2n’), наиболее вероятную оценку количества видов с использованием четырех ядерных локусов в STACEY, и разграничение видов на основе ddRAD топологии с использованием подходов “обрезки ветвей” (‘branch-cut’) и mPTR. (б-г) Расширенное представление секций дерева для *L. brunneus* (б), *L. melanonyx* (г) и *L. simensis* (е). Различные цвета концевых ветвей соответствуют разным мтДНК линиям, представленным на рисунке 3.

Результаты анализа sNMF на основе двух альтернативных наборов SNP данных, присутствующих для 30% (13 586 SNP) и 90% (787 SNP) экземпляров, согласуются с результатами филогенетических реконструкций отдельных ядерных маркеров и методов



разграничения видовых границ (Рис. 6). Кроме этого, при увеличении параметра К для *L. chrysopus*, *L. melanonyx* и *L. brevicaudus*, начинает прослеживаться филогеографическая структура. Для *L. simensis* подобная структура выражена даже при меньших значениях К.

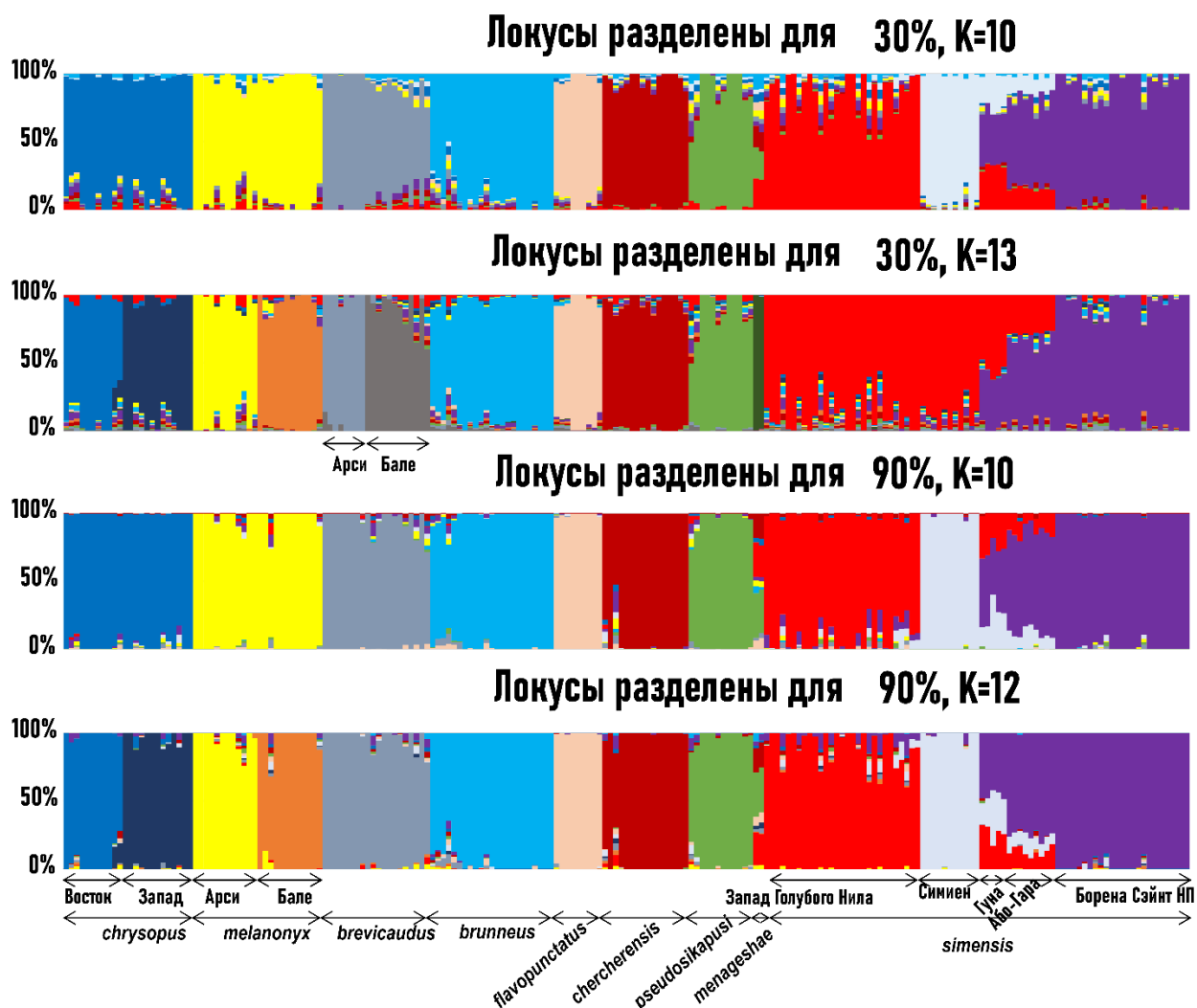


Рисунок 6. (а) Анцестральные коэффициенты, полученные в анализе sNMF, показывают значения  $Q$ -матриц для разных наборов данных (SNP присутствуют у 30% или 90% особей) и количества предковых популяций ( $K = 10$ , идентифицированных по критерию “колена” для двух наборов данных,  $K = 13$  или  $12$ , полученных с помощью критерия абсолютного минимума энтропии в 30% и 90% наборов данных соответственно).

**3.3. Видовое дерево и датирование узлов дивергенции.** Видовое дерево, реконструированное в \*BEAST (Рис. 7а), совпадает с таковым на основе ddRAD данных в характере деления на четыре монофилетические клады видов с одинаковым диплоидным числом хромосом. Несмотря на хорошее разрешение четырех клад во всех анализах ядерных данных, в характере ветвления обнаружены незначительные различия (Рис. 7а и Рис. 5а): на видовом дереве базальное положение занимает *L. melanonyx* (Рис. 7а), в то время как на дереве ddRAD – *L. chrysopus* (Рис. 5а). Также несоответствие выявлено между 68- и 70-хромосомными группами: сестринскими видами являются *L. flavopunctatus* и *L. brevicaudus* (BS = 97) на ddRAD-дереве и *L. flavopunctatus* и *L. brunneus* (PP = 0,91) — на видовом дереве; *L. simensis* занимает базальное положение на видовом дереве (PP = 0,98), в то время как на ddRAD-дереве он является сестринским по отношению к *L. menageshae* (BS = 94). Обнаруженные несоответствия можно объяснить быстрой диверсификацией предковых линий *L. melanonyx*, *L. chrysopus* и клады, объединяющей всех эфиопских *Lophuromys* с  $2n = 68$  и  $70$



и, как следствие, недостаточностью филогенетического сигнала четырех ядерных генов для разрешения отдельных ветвей.

Результаты молекулярного датирования в \*BEAST (Рис. 7а) относят начало адаптивной радиации надвидового комплекса *L. flavopunctatus* к среднему плейстоцену (1,6 – 0,6 млн. лет назад). Ретикулярная эволюция, по-видимому, сопровождавшая радиацию эфиопских *Lophuromys*, также имела место в среднем плейстоцене (Рис. 7б).

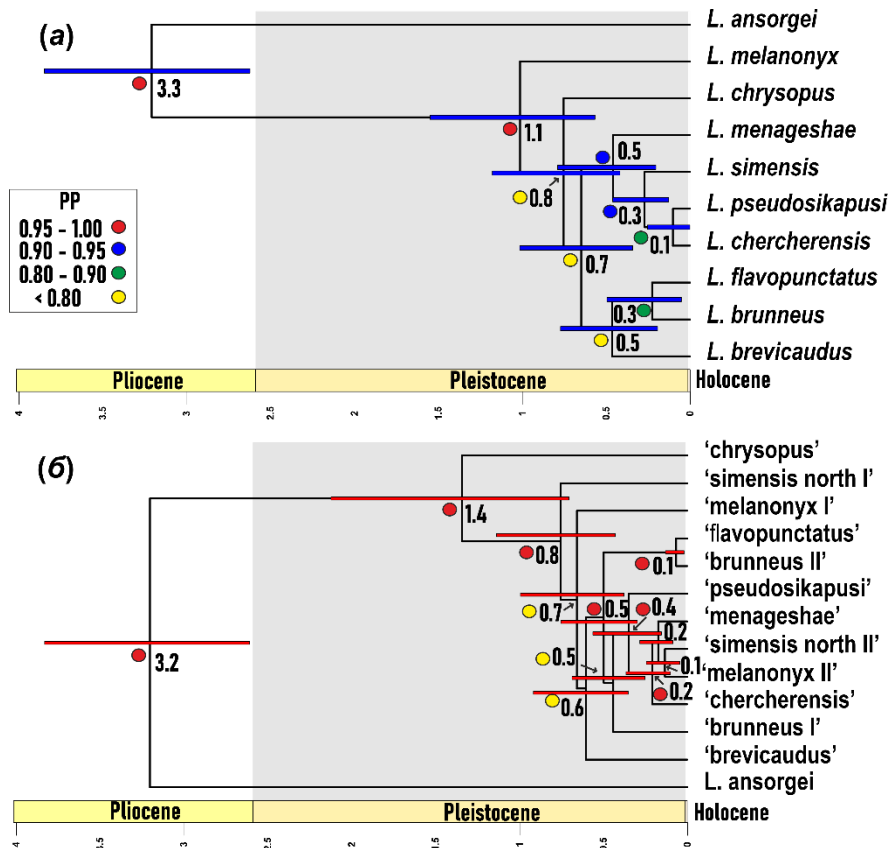
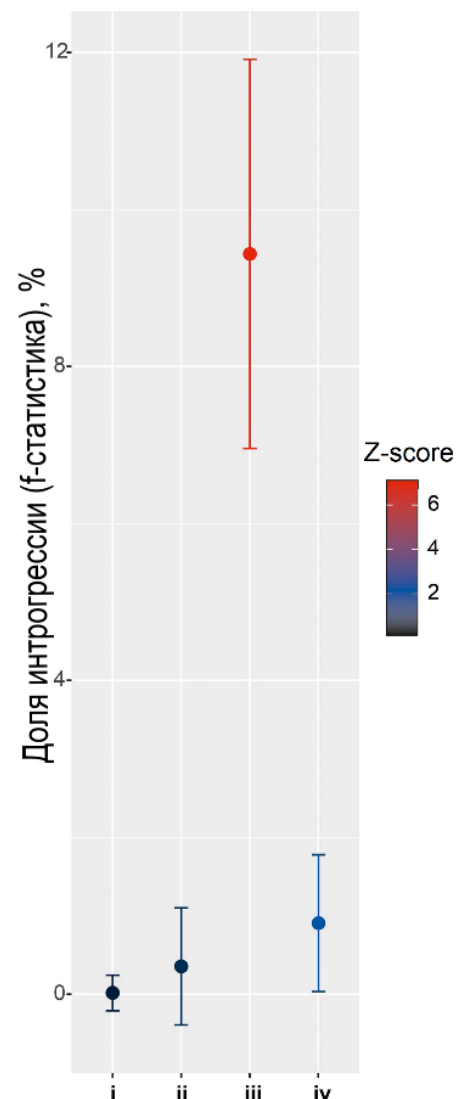


Рисунок 7. Временное датирование ядерной (а) и митохондриальной (б) филогении в \*BEAST. Числа в узлах деревьев указывают средний возраст на основе оценок молекулярных часов, а цветные линии обозначают 95% доверительные интервалы. Апостериорные вероятности узлов представлены кружками разных цветов (см. легенду).



**3.4. Свидетельства межвидовой интрогрессии ядерного генома.** Результаты АВВА-БАВА теста (Рис. 8) не выявили статистически значимых следов интрогрессии ядерного генома между видами эфиопских *Lophuromys*, предположительно вовлеченными в события древней интрогрессии мтДНК (между парами *L. menageshae* => *L. melanonyx* и *L. menageshae* => *L. simensis*). При относительно недавних событиях гибридизации обнаружены слабые следы ядерной интрогрессии (Z-scores = 2,03) от *L. menageshae* к популяции *L. simensis* из Борена Сэйнт (доля интрогрессии – 0,9%), а также хорошо подтвержденные следы интрогрессии (Z-scores = 7,1) между *L. flavopunctatus* и *L. brunneus* (доля интрогрессии – 9,43%)

Рисунок 8. Доля интрогрессированных локусов (f-статистика) у пар видов, вовлеченных в предполагаемые разновременные события интрогрессии: (I) *L. menageshae* и *L. melanonyx*; (II) *L. menageshae* и *L. simensis*; (III) *L. flavopunctatus* и *L. brunneus*; (IV) *L. menageshae* и *L. simensis* из Борена Сэйнт. Первые две пары видов не показали каких-либо значимых следов интрогрессии (Z-scores 0,16 и 0,94 соответственно).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

**4.1. Филогенетические взаимоотношения и видовое разнообразие крапчатых жестковолосых мышей надвидового комплекса *Lophuromys flavopunctatus* s.l. в свете молекулярно-генетических исследований.** Использование расширенной выборки эфиопских *Lophuromys* (322 экземпляра) и применение геномных методов (получение полных митогеномов и SNP методом ddRAD) позволило окончательно подтвердить видовую самостоятельность девяти видов эфиопских *Lophuromys* на территории ЭН.

Генетический анализ, выполненный в рамках настоящей работы, позволил дополнить известные данные о распространении эфиопских *Lophuromys* и существенно расширить границы ареалов ряда видов (Рис. 9).

Для типичного лесного вида *L. chrysopus* выявлено выраженное деление митохондриальных гаплотипов на две группы, соответствующие популяциям к востоку (горы Арси и Бале) и западу (леса Годаре, Чингава, Шеко и Белетта) от Рифтовой Долины (Рис. 3а). Это позволяет предположить, что в настоящее межледниковье аридные территории Рифтовой долины являются непреодолимым барьером для потока генов между популяциями лесных видов, населяющих ее противоположные стороны.

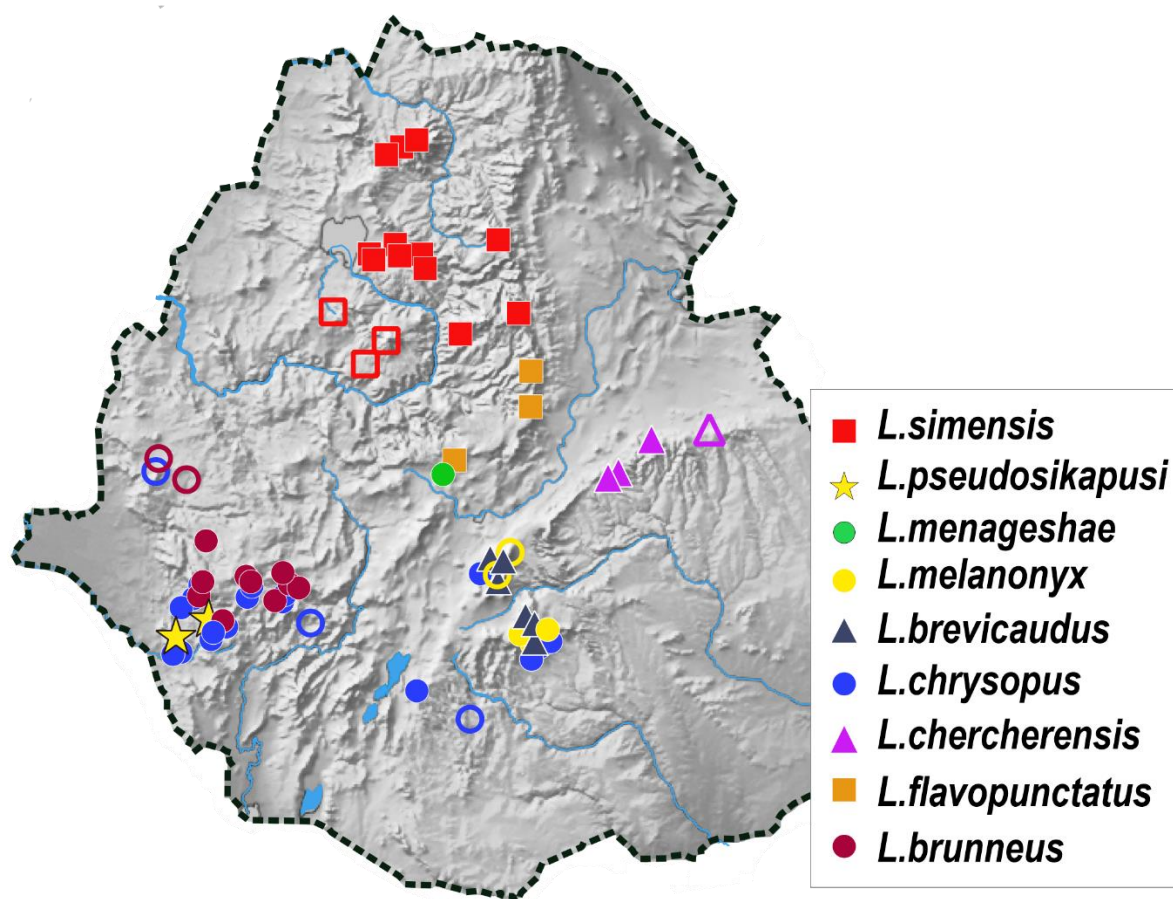


Рисунок 9. Карта распространения эфиопских *Lophuromys* (по данным молекулярно-генетического анализа). Прозрачные фигуры с цветным контуром обозначают локалитеты, позволившие в рамках нашего исследования существенно расширить границы ранее известных ареалов соответствующих видов (см. легенду).

Несмотря на то, что окончательная видовая идентификация экземпляров из Дебре-Сины (северо-западное плато), определенных по морфологическим признакам как *L. melanonyx* (Yalden et al., 1976; Рис. 1, 3б), требует генетического подтверждения, нельзя отрицать возможности исторического распространения этого афро-альпийского вида в данном регионе. Тем не менее, отсутствие находок данного вида во время работы териологического отряда СРЭБЭ в Дебре-Сине (2011 г.) позволяет предположить, что небольшая изолированная реликтовая популяция *L. melanonyx*, найденная к западу от Рифтовой долины, может представлять собой остатки самой северной популяции этого вида, видимо вымершей между 1975 и 2011 гг. Это может свидетельствовать об уязвимости узкоареальных афро-альпийских эндемиков Эфиопии в условиях глобального потепления и стремительной антропогенной трансформации природных ландшафтов.

Сходный филогеографический паттерн распространения, когда наиболее южные местообитания северо-западного плато населены представителями фауны юго-восточного плато, выявлен у других групп грызунов (Bryja et al., 2018) и амфибий (Evans et al., 2011; Freilich et al., 2016). Можно предположить, что лесные виды могли пересекать территорию Рифтовой долины во влажные и теплые периоды межледниковий по “лесным коридорам”, в то время как афро-альпийские виды — в ледниковые периоды по коридорам афро-альпийской растительности. Это также может объяснить широкое распространение современных видов *L. flavopunctatus* s.l. на территории большей части тропической Африки за пределами Эфиопии (Onditi et al., 2021).

Поскольку анализ ядерных генов показал филогенетическую гомогенность популяций с разными гаплогруппами мтДНК каждого из трех видов (*L. brunneus*, *L. melanonyx* и *L. simensis*) эфиопских *Lophuromys* (Рис. 5 б,в,г), нет сомнений в их конспецифичности.

**4.2. Интенсивная адаптивная радиация в среднем плейстоцене и следы разновременных ретикулярных процессов.** Полученные результаты позволяют предположить формирование генетического разнообразия эфиопских *Lophuromys* в результате адаптивной радиации, сопровождаемой сложным взаимодействием дивергентных (аллопатрическое видообразование) и ретикулярных процессов.

Наше исследование не выявило сестринских взаимоотношений между видами эфиопских *Lophuromys*, замещающих друг друга вдоль выраженного высотного градиента горных массивов Арси и Бале (*L. chrysopus*, *L. brevicaudus* и *L. melanonyx*; рис. 1, 9), а также населяющих вулканический массив Тепи (леса Годаре и Чингава; *L. chrysopus* – *L. brunneus*) (рис. 1, 9), что следовало бы ожидать в рамках градиентной модели видообразования. Можно предположить, что эволюция этих видов протекала согласно модели аллопатрического видообразования. Ранее было предположено, что *L. chrysopus* и *L. brunneus* замещают друг друга в смежных лесных поясах вулканического массива Тепи (Лавренченко, 2011), однако наше генетическое исследование расширенного набора выборок выявило сосуществование этих видов на протяжении широкого высотного диапазона (1400 – 2330 м. над ур. моря). На меньших высотах данного вулканического массива (700 – 1350 м. над ур. моря) обитает только *L. chrysopus*.

Наиболее молодая пара сестринских видов эфиопских *Lophuromys* включает *L. chercherensis* и *L. pseudosikapusi* (рис. 5а), населяющих далеко отстоящие друг от друга регионы: Черчерские горы и леса крайнего юго-запада страны (рис. 1, 9). Такие особенности современного распространения этих двух видов позволяют предполагать соответствие их эволюционной дивергенции аллопатрической модели видообразования.

Полученные временные оценки дивергенции (Рис. 7) позволяют отнести событие обособления *L. flavopunctatus* s.l. к середине плиоцена (3,7 – 2,6 млн. лет назад), произошедшего, по-видимому, в результате изоляции населявшего влажные тропические леса последнего общего предка данного комплекса на территории ЭН, формирование которого уже было завершено к этому времени. Оценки времени начала интенсивной диверсификации в пределах комплекса (1,6 – 0,6 млн. лет назад) относят данное событие к среднему плейстоцену. Это могло быть связано с началом более продолжительных засушливых ледниковых эпох, а

также возникновением на территории ЭН сухих горных лесов, верещатников и высокогорных травянистых сообществ, потеснивших вечнозеленые тропические леса в период среднелепистоценового перехода (1,2 – 0,8 млн. лет назад; Bonnefille, 1983; Bonnefille et al., 2018). В ледниковые периоды существенное сокращение лесов приводило к фрагментации ареалов лесных видов (Souvreur et al., 2021) и, вероятно, полному прекращению потока генов между географически обособленными популяциями. С течением времени, изолированные популяции эволюционировали в аллопатрические виды, вторичные перекрытия ареалов которых становились возможными в межледниковые периоды, когда леса восстанавливали свои площади. Миграции особей могли способствовать интенсификации межвидовых контактов и гибридизации между вновь возникшими видами, не обладающими выраженной репродуктивной изоляцией.

Таким образом, наличие двух не монофилетичных митохондриальных гаплогрупп у каждого из трех видов (*L. brunneus*, *L. melanonyx* и *L. simensis*) эфиопских *Lophuromys* (см. рис. 2, 3а), вероятно, представляет собой результат одновременных событий межвидовой гибридизации в достаточно отдаленном прошлом. Можно предположить, что занимающие базальные позиции на филогенетическом дереве гаплогруппы ‘*melanonyx I*’, ‘*simensis north I*’ и ‘*brunneus I*’ — предположительно видоспецифичные линии для *L. melanonyx*, *L. simensis* и *L. brunneus* соответственно. В отношении *L. melanonyx* и *L. brunneus* это не вызывает сомнений, поскольку по анализам яДНК (Рис. 5а) клады этих видов соответствуют позициям отдаленных гаплогрупп (‘*brunneus I*’ и ‘*melanonyx I*’) на митохондриальных деревьях (Рис. 4). По результатам анализа ядерного генома (Рис. 5а) клада *L. simensis* соответствует положению линии ‘*simensis north II*’ на митохондриальных деревьях (Рис. 4) и также демонстрирует сестринский характер взаимоотношений с *L. menageshae*. В соответствии с этим, гаплогруппа ‘*simensis north II*’ – видоспецифична, в то время как ‘*simensis north I*’ могла быть заимствована в результате древней гибридизации от вымершей предковой линии. Однако, обнаружение нами в популяциях *L. simensis* (Борена Сэйнт и Камбольча) особей с гаплотипами мтДНК современного *L. menageshae* (Рис. 2, 3 г,д; 3а), а также обнаружение только гаплогрупп ‘*simensis north I*’ в изолированных каньоном Голубого Нила популяциях горы Чока и ее окрестностей (Рис. 3з), свидетельствуют в пользу видоспецифичности линии ‘*simensis north I*’. Гаплогруппы ‘*melanonyx II*’, ‘*simensis north II*’ могли быть интрогрессированы в процессе “древней” гибридизации с *L. menageshae*. В свою очередь, ‘*brunneus II*’, монофилетическая с ‘*flavopunctatus*’, могла быть интрогрессирована от последнего вида. Кроме этого, обнаружение популяций *L. simensis* в Борена Сэйнт и Камбольче, а также популяций *L. brunneus* в лесу Белетта, несущих мтДНК *L. menageshae* и *L. flavopunctatus* соответственно, вероятно, представляют собой пример “современной” межвидовой гибридизации, что подтверждается наличием следов ядерной интрогрессии (Рис. 8).

Весьма вероятно, что ареалы распространения гибридизирующих видов ранее были значительно шире и могли перекрываться в прошлом, что приводило к контактам между популяциями соответствующих видов (*L. menageshae* с *L. melanonyx* и *L. simensis*, а также *L. flavopunctatus* с *L. brunneus*) и заимствованию “чужой” мтДНК. Ныне их ареалы географически достаточно разобщены (Рис. 9). Отметим, что *L. melanonyx* и *L. menageshae* характеризуются выраженными хромосомными различиями (2n=60 и 2n=70, соответственно), по-видимому, представляющими эффективные репродуктивные барьеры. Мы предполагаем, что “древняя” межвидовая гибридизация происходила во времена, когда хромосомные различия между этими линиями были выражены существенно меньше.

Поскольку не удалось обнаружить свидетельств потока ядерных генов в популяции, вовлеченные в предполагаемые события “древней” интрогрессии мтДНК, и лишь незначительный ее след для случаев условно “недавних” процессов гибридизации (Рис. 8), можно предположить, что заимствованная доля ядерного генома не способна закрепиться в геномах видов-реципиентов и быстро элиминируется из популяции в течение нескольких поколений.

**4.3. Возможные эволюционные сценарии предполагаемой митохондриальной интрогрессии.** Если предположить, что митохондриальные белки системы OXPHOS у *L. menageshae* (или его предка) были в силу случайных процессов преадаптированы для функционирования в условиях высокогорья, то интрогрессия мтДНК от этого вида могла позволить *L. melanonyx* и *L. simensis* успешно заселить афро-альпийские местообитания. Кроме того, случаи разновременной интрогрессии мтДНК от *L. menageshae* популяциями *L. simensis* могут косвенно подтверждать ее адаптивный характер. Так же в пользу этого предположения может свидетельствовать тот факт, что населяющие наибольшие высоты популяции *L. melanonyx* и *L. simensis* обладают только предположительно заимствованной мтДНК ('*melanonyx II*' и '*simensis north II*' соответственно; рис. 10).

Можно предложить альтернативный взгляд на концепцию адаптивной интрогрессии мтДНК, объясняющий ее не как следствие "лучшей приспособленности" заимствованной мтДНК, а как возможность замены исходной мтДНК, "перегруженной" вредными мутациями в "жестких" условиях афро-альпийской зоны. Ускорение темпов мутирования мтДНК в условиях высокогорья может быть следствием влияния следующих факторов: усиленной продукции активных форм кислорода (АФК) митохондриями (Dosek et al., 2007), повышенной УФ-радиации (Colbourne et al., 2006), малочисленности и выраженной динамики численности афро-альпийских видов (Лавренченко Л.А., личн. сообщение). В этой ситуации, продуцируемые в повышенных количествах в условиях высокогорья АФК выступают скорее, как физическая причина "повреждений" мтДНК, а малочисленность и выраженная динамика численности афро-альпийских популяций должны быть рассмотрены в качестве основного механизма ускоренного накопления вредных замен, индуцированных АФК. Можно предположить адаптивную замену исходных митохондриальных геномов в небольших популяциях двух афро-альпийских видов (*L. melanonyx* и *L. simensis*), приспособленность которых была снижена из-за накопления вредных мутаций, зафиксированных генетическим дрейфом. Здесь можно провести некоторую аналогию с храповиком Мёллера, предсказывающим снижение приспособленности из-за накопления вредных мутаций в геномах малочисленных популяций бесполок организмов, не имеющих механизмов рекомбинации генетического материала (Muller, 1964). Необходимым условием избавления от ограничений, накладываемых храповиком Мёллера, у таких организмов стали эффективные механизмы горизонтального переноса генов. По аналогии с этим процессом, интрогрессия «чужой» мтДНК может обеспечить возможность избежать катастрофических последствий накопления вредных мутаций в нерекомбинантных митохондриальных геномах высокогорных малочисленных популяций.

Наряду с вышеуказанными сценариями, интрогрессия и последующее закрепление "чужой" мтДНК могут иметь и нейтральный характер. Вследствие плейстоценовых колебаний климата границы высотных поясов растительности меняли свое положение, что закономерно приводило к изменению ареалов видов мелких млекопитающих. Миграции в эти периоды могли приводить к интенсификации контактов между близкими видами и гибридизации с последующей интрогрессией мтДНК. Можно предположить, что поскольку значительные колебания численности наиболее характерны для видов мелких млекопитающих, населяющих узкие и фрагментированные афро-альпийские местообитания, именно в таких популяциях с высокой вероятностью может закрепиться (вплоть до полной фиксации) мтДНК другого вида. Причина также может заключаться в потенциальных возможностях проникновения видов, обитающих в каждом из этих высотных поясов, в смежные высотные пояса. Известно, что отдельные виды эфиопских *Lophuromys*, обитающие в более высоких поясах, обычно вселяются в ниже расположенные пояса по интразональным биотопам, имитирующим привычные условия их местообитаний, но не наоборот (Лавренченко Л.А., личн. сообщение). Таким образом, вероятным представляется сценарий, при котором обитающие на афро-альпийских "островках" небольшие популяции двух видов эфиопских *Lophuromys* (*L. melanonyx* и *L. simensis*), заимствовали мтДНК обитающего на более низких высотах *L. menageshae* во время расселения вниз по склону в холодные ледниковых периоды.



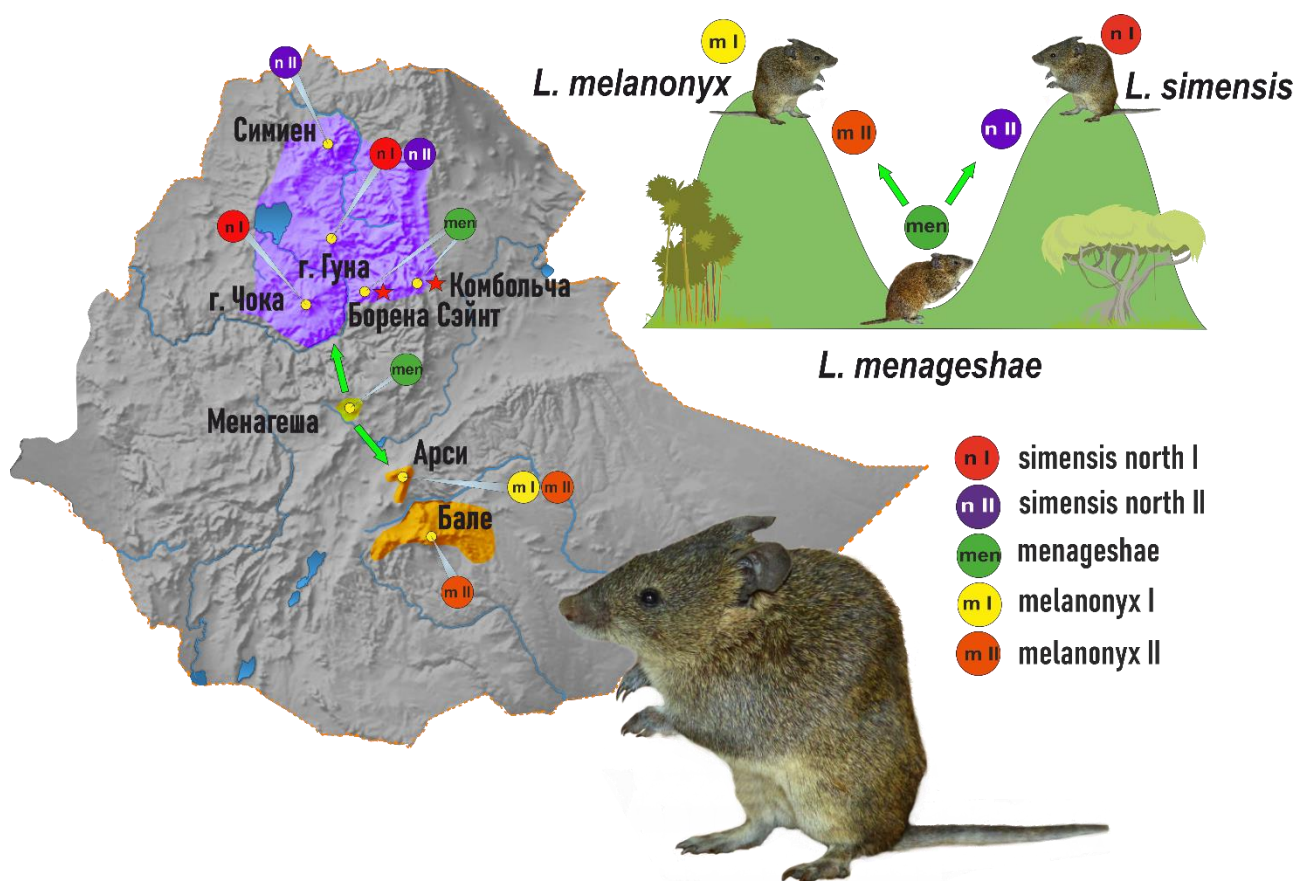


Рисунок 10. Иллюстрация предполагаемого эволюционного сценария интрогрессии мтДНК от *L. menageshae* к *L. melanonyx* и *L. simensis* (рисунок в правом верхнем углу). Современные ареалы этих видов окрашены в зеленый цвет (*L. menageshae*), оранжевый (*L. melanonyx*) и лиловый (*L. simensis*). Цветные кружки иллюстрируют митохондриальные линии (легенда в правом нижнем углу). Предполагаемые случаи недавней интрогрессии мтДНК от *L. menageshae* к *L. simensis* отмечены красными звездочками.

Следует отметить, что вышеописанные эволюционные сценарии интрогрессии мтДНК не несут строго взаимоисключающего характера. В некоторой степени альтернативными можно считать первые два. Первый сценарий адаптивной интрогрессии мтДНК предполагает заимствование митохондриального генома *L. menageshae* в то время, когда предки *L. melanonyx* и *L. simensis* еще не заселили афро-альпийские местообитания. Второй сценарий — замена “перегруженной” вредными мутациями мтДНК — подразумевает, что предки *L. melanonyx* и *L. simensis* сначала заселили афро-альпийскую зону, а затем, при длительном существовании в условиях активных форм кислорода и иных факторов среды исходные митохондриальные геномы этих двух видов могли накопить значительное количество вредных мутаций. Третий сценарий нейтральной интрогрессии мтДНК скорее должен быть рассмотрен в качестве механизма, обеспечивающего межвидовую интрогрессию “чужого” митохондриального генома. Описанные выше эволюционные сценарии в разной степени вероятны для рассматриваемых видов (*L. melanonyx*, *L. simensis*). Так, можно предположить, что второй сценарий (замена “испорченной” мтДНК) выглядит более правдоподобным для *L. melanonyx* — вида, строго специализированного к обитанию в афро-альпийской зоне. Ряд его уникальных адаптаций, таких как выраженная дневная активность и парадоксальное снижение теплоизоляции волосяного покрова, облегчающее использование солнечного излучения для поддержания теплового баланса тела (Ивлев, Лавренченко, 2016) подтверждают это. Колониальный образ жизни, тревожная стойка столбиком и звуковой сигнал предупреждения об опасности, характерные для этого вида, типичны для ряда групп грызунов, населяющие

открытые ландшафты. Поскольку из всех потенциальных местообитаний эфиопских *Lophuromys* только афро-альпийская зона относится к категории открытых ландшафтов, можно также предположить достаточно давнее освоение *L. melanonyx* данного биотопа. Для более эврибионтного *L. simensis* более вероятным видится первый сценарий (преимущество заимствованной мтДНК). Отдельные популяции этого вида, обитающие вдоль значительного высотного градиента (в том числе, и населяющие высокогорья), не отличаются существенным образом по экологии и поведению от остальных видов эфиопских *Lophuromys* (за исключением *L. melanonyx*), что позволяет предполагать относительно недавнее заселение *L. simensis* афро-альпийской зоны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении кратко сформулированы итоги работы.

## ВЫВОДЫ

- 1) Результаты всестороннего анализа с использованием полных митохондриальных геномов, а также ядерных (включая ddRAD данные) маркеров, хорошо согласуются с известными представлениями о таксономическом разнообразии надвидового комплекса *Lophuromys flavopunctatus* s.l. Подтверждена видовая самостоятельность девяти видов на территории Эфиопского нагорья. Существенно дополнены имеющиеся сведения о распространении ряда видов этого комплекса.
- 2) Полученные оценки времен дивергенции позволяют предполагать интенсивную диверсификацию данного комплекса на протяжении среднего плейстоцена, связанную с фрагментацией лесных массивов и развитием высокогорных ландшафтов.
- 3) Полученные филогенетические паттерны и особенности современного распространения отдельных видов свидетельствуют о соответствии процессов эволюционной дивергенции эфиопских *Lophuromys* «аллопатрической» модели видообразования.
- 4) Несогласованность филогенетических реконструкций эфиопских *Lophuromys*, полученных на основе митохондриальных и ядерных маркеров, может быть объяснена разновременными событиями межвидовой гибридизации, сопровождавшимися интрогрессией мтДНК.
- 5) Предположение об относительно недавней гибридизации между *L. brunneus* и *L. flavopunctatus* s.s. подтверждено анализом ядерных (включая ddRAD данные) маркеров и полных митохондриальных геномов. Впервые выявлены свидетельства современной гибридизации между этими видами, а также между *L. menageshae* и *L. simensis*.
- 6) Благодаря обнаружению второй глубоко дивергировавшей митохондриальной гаплогруппы у *L. melanonyx* определена исходная видоспецифичность митохондриальных геномов для всех трех видов (*L. melanonyx*, *L. menageshae* и *L. simensis*), предположительно вовлеченных в процессы древней межвидовой гибридизации.
- 7) Современное генетическое разнообразие эфиопских видов *Lophuromys* сформировалось в результате сочетания как дивергентных, так и множественных ретикулярных процессов. Для объяснения причин интрогрессии мтДНК у двух афро-альпийских видов (*L. simensis*, *L. melanonyx*) выдвинуты гипотезы, включающие как адаптивные (преимущество заимствованной мтДНК и замена мтДНК, “перегруженной” вредными мутациями), так и неадаптивные сценарии.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК:

1) Kostin D.S., Kasso M., **Komarova V.A.**, Martynov A.A., Gromov A.R., Alexandrov D.Y., Bekele A., Chemere Z., Bryja J., Lavrenchenko L.A. Taxonomic and genetic diversity of rodents from the Arsi Mountains (Ethiopia) // *Mammalia*. – 2019. – Vol. 83. – № 3. – P. 237-247. IF=0,679; DOI: 10.1515/mammalia-2017-0135.

2) Kostin D.S., Martynov A.A., **Komarova V.A.**, Alexandrov D.Y., Yihune M., Kasso M., Bryja J., Lavrenchenko L.A. Rodents of Choke Mountain and surrounding areas (Ethiopia): the Blue Nile gorge as a strong biogeographic barrier // *Journal of Vertebrate Biology*. – 2020. – Vol. 69. – № 2. – P. 1-12. IF=0,594; DOI: 10.25225/jvb.20016.

3) **Komarova V.A.**, Kostin D.S., Bryja J., Mikula O., Bryjová A., Čížková D., Šumbera R., Meheretu Y., Lavrenchenko L.A. Complex reticulate evolution of speckled brush-furred rats (*Lophuromys*) in the Ethiopian centre of endemism // *Molecular Ecology*. – 2021. – Vol. 30. – № 10. – P. 2349-2365. IF=6,185; DOI: 10.1111/mec.15891.

4) **Комарова В.А.**, Лавренченко Л.А. Методы выявления гибридизации и генетической интрогрессии при филогенетических несоответствиях // *Журнал общей биологии*. – 2021. – Т. 82. – № 6. – С. 403-418. IF=0,534; DOI: 10.1134/S2079086422030045.

5) **Komarova V.A.**, Mugee N.S., Kostin D.S., Lavrenchenko L.A. Uncovering the diversity of endemic Ethiopian fauna: complete mitochondrial genomes of four *Lophuromys* species (Rodentia, Muridae) // *Mitochondrial DNA Part B*. – 2022. – Vol. 7. – № 6. – P. 1001-1004. IF=0.61; DOI: 10.1080/23802359.2022.2079435.

6) Martynov A.A., Zemlemerova E.D., Kostin D.S., **Komarova V.A.**, Gromov A.R., Yihune M., Tsegaye A., Alexandrov D.Y., Bekele A., Bryja J., Lavrenchenko L.A. Uncovering the diversity of rodents and shrews in the Chebera Churchura National Park, Ethiopia // *Mammalia*. – 2023. – Vol. 87. – № 5. – P. 1-13. IF= 1; DOI: 10.1515/mammalia-2022-0127.

### Тезисы конференций:

1) **Komarova V.A.**, Kostin D.S., Šumbera R., Meheretu Y., Bryja J., Lavrenchenko L.A. Evolutionary patterns and speciation along steep altitudinal gradient: a case study of Ethiopian speckled brush furred mice *Lophuromys flavopunctatus* s.l. // Тез. В сб: The 13<sup>th</sup> African Small Mammal Symposium in Mekelle, Ethiopia, and the evolution of these meetings // *Journal of Vertebrate Biology* – Vol. 69. – № 2. – P. E2002.1–5.

2) **Комарова В.А.** Разнообразие и ретикулярная эволюция надвидового комплекса желтоточечных мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l. Эфиопского нагорья // Тез. В сб: Материалы международного молодежного научного форума «ломососов-2021» ISBN 978 – 5 – 317 – 06593 – 5.

3) **Комарова В.А.**, Костин Д.С., Лавренченко Л.А. Сочетание дивергентных и ретикулярных процессов как источник генетического разнообразия эфиопских видов крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l. // Тез. В сб: Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии (XI Съезд Териологического общества при РАН). Материалы конференции с международным участием, 14–18 марта 2022 г., г. Москва, ИПЭЭ РАН. М.: Тов-во научных изданий КМК. – 2022.– С. 430.

4) **Комарова В.А.**, Костин Д.С., Лавренченко Л.А. Тенденции в эволюции митохондриального генома у млекопитающих горных тропиков // Тез. В сб: Современные проблемы биологической эволюции: материалы IV Международной конференции к 875–летию Москвы и 115–летию со дня основания Государственного Дарвиновского музея, 17–20 октября 2022, г. Москва. – М.: ГДМ – 2022. – С. 462.