

Костин Данила Сергеевич

**Генетические аспекты адаптивной радиации
узкоголовых крыс рода *Stenocephalemys***

03.02.04 – зоология

03.02.07 – генетика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2019

Работа выполнена в Лаборатории микроэволюции млекопитающих Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук и Лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

**Научные
руководители:**

Лавренченко Леонид Александрович

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

Баклушинская Ирина Юрьевна

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эволюции генома и механизмов видообразования ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

**Официальные
оппоненты:**

Кораблёв Николай Павлович

доктор биологических наук, доцент, профессор, заведующий кафедрой «Зоотехния и ТППЖ», ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной биологии ФГБОУ ВО «Великолукская государственная сельскохозяйственная академия»

Матросова Вера Анатольевна

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории структурно-функциональной геномики ФГБУН Институт Молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

**Ведущая
организация:**

ФГБУН Институт систематики и экологии животных СО РАН

Защита состоится «__» _____ 2019 года в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета Д 002.213.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д33. Тел/факс: +7(495)952-73-24, e-mail: admin@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: www.sev-in.ru и на сайте высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации по адресу:

vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Е.А. Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Эфиопское нагорье – уникальная биогеографическая область, характеризующаяся высоким уровнем эндемизма среди мелких млекопитающих, что делает ее подходящим природным полигоном для исследования процессов видообразования (Lavrenchenko, Bekele, 2017). Богатое видовое разнообразие горных тропиков объясняется большим количеством экологических ниш, сохраняющихся во время вековых колебаний климата, что позволяло как старым, так и недавно появившимся формам переживать неблагоприятные периоды плейстоцена (Hewitt, 2000). Реконструкция эволюционных историй мелких млекопитающих горных тропиков представляет особый интерес, так как для этих групп характерны интенсивные процессы адаптивной радиации в процессе освоения новых экологических ниш. Из-за ярко выраженного высотно-температурного градиента давление отбора при адаптации к суровым условиям высокогорий может быть особенно велико. В связи с этим, именно среди представителей фауны горных тропиков, представляется вероятным существование групп, диверсификация которых шла в соответствии с градиентной моделью видообразования (Лавренченко, 2011). Согласно этой модели видообразования, основным фактором, приводящим к разделению единой популяции, является экологически обусловленный дизруптивный отбор. Предполагается, что отбор на адаптацию к определенным условиям среды оказывается настолько сильным, что существование потока генов между популяциями не препятствует началу процесса их дивергенции (Nossil, 2012).

Адаптация к суровым условиям высокогорья, сопряженным с гипотермией, может затрагивать систему клеточного дыхания, ответственную за производство энергии в организме и выработку тепла (Mitchell, 1961). Ключевые белки системы окислительного фосфорилирования, кодируемые митохондриальным геномом, могут выступать основной мишенью для адаптивных изменений. При межвидовой интрогрессии в результате процессов гибридизации, заимствование чужой, несколько более адаптированной митохондриальной ДНК (мтДНК), может оказываться эволюционно «удачным» путем для популяций, стоящих перед необходимостью адаптации к условиям холодного климата (Roriquet, Hassanin, 2006).

На территории Эфиопии, представляющей собой совокупность горных массивов, разделенных как Рифтовой долиной, так и каньонами крупных рек, формируется большое количество потенциальных экологических ниш. Интенсивные климатические флуктуации, имевшие место в плейстоцене, оказывали значительное влияние на формирование

эндемичной фауны Эфиопского нагорья (Gotelli et al., 2004; Evans et al., 2011). Одной из групп, происхождение и адаптивная радиация которой была связана исключительно с территорией Эфиопского нагорья, является род узкоголовых крыс *Stenocephalemys*. Виды этого рода парapatрично замещают друг друга в смежных высотных поясах, что позволяет предположить общее соответствие процессов их диверсификации модели градиентного видообразования. Хотя ранние исследования этой группы поставили под сомнение данное предположение (Лавренченко, Верхейен, 2006), следует отметить, что заключение было основано на результатах исследования исключительно мтДНК. Многочисленные примеры несоответствия филогенетических реконструкций, полученных на основе мтДНК и ядерной ДНК (ядДНК), позволяют сделать вывод о том, что использование в качестве маркеров для анализа одной лишь мтДНК может вести к искаженной оценке филогенетических отношений (Тоews, Brelsford, 2012). Учитывая необходимость детального филогенетического анализа данной группы, требующегося, с одной стороны, для таксономической ревизии рода, а с другой, для выявления возможных генетических адаптаций к условиям высокогорья, была сформулирована следующая цель исследования:

Цель исследования: Установление филогенетических отношений между представителями рода *Stenocephalemys*, реконструкция их эволюционной истории, изучение генетических аспектов адаптации к условиям высокогорья.

Для достижения обозначенной цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести детальный филогенетический и филогеографический анализ митохондриальных линий различных форм *Stenocephalemys*.
2. Сопоставить филогенетические реконструкции, основанные на данных по шести ядерным маркерам, с результатами, полученными при анализе митохондриального гена цитохрома b (*cytb*).
3. С использованием результатов проведенного мультилокусного анализа выявить и охарактеризовать события межвидовой гибридизации, определить их относительный возраст, оценить возможное адаптивное значение интрогрессии мтДНК.
4. Провести реконструкцию эволюционной истории рода *Stenocephalemys* на основании полученных филогенетических взаимоотношений, палеогеографических данных и особенностей современного распространения отдельных видов.

Научная новизна. Использование мультилокусного анализа позволило пересмотреть ранние представления о видовом разнообразии группы и филогенетических отношениях между отдельными видами. Обнаруженный паттерн родственных связей внутри видов рода позволил предположить течение их диверсификации согласно *градиентной* модели видообразования. Высказана гипотеза о нескольких одновременных событиях гибридизации, сопровождавшихся интрогрессией мтДНК. Впервые показано, что молекулярные адаптации к условиям высокогорья могут формироваться на основе сочетания процессов интрогрессии и последующей конвергентной молекулярной эволюции.

Теоретическая и практическая значимость работы. Вопреки традиционным представлениям о разнонаправленности дивергентных и ретикулярных процессов в ходе эволюции, результаты данной работы позволяют рассматривать узкоголовых крыс *Stenocephalemys* как модельную группу, современное разнообразие которой сформировалось благодаря сочетанию этих процессов. Полученные результаты вносят вклад в понимание процессов видообразования и адаптации мелких млекопитающих. Комплексный подход, использованный в работе, может быть использован при исследовании других групп мелких млекопитающих горных тропиков.

Один из видов узкоголовых крыс, *S. albipes*, обнаруживает склонность к синантропии, и с высокой численностью встречается в жилищах человека. При этом недавно было показано, что этот вид является резервуаром нового вида хантавируса, второго из известных на сегодняшний день африканских хантавирусов, связанных с трибой Murini (Meheretu et al., 2012). Детальное исследование филогеографической структуры носителя нового потенциального патогена человека представляется необходимым для понимания возможного эпидемиологического риска.

Положения, выносимые на защиту:

1. Адаптивная радиация узкоголовых крыс *Stenocephalemys* включала как процессы дивергенции, соответствующие моделям аллопатрического и градиентного видообразования, так и одновременные процессы интрогрессии мтДНК, предположительно адаптивного характера.
2. Формирование молекулярных адаптаций к условиям высокогорья у отдельных представителей узкоголовых крыс предположительно включало как заимствование чужой мтДНК, так и ее последующую конвергентную «доработку».

Личный вклад соискателя. Автором лично был проведен сбор проб в течение четырех экспедиций в Эфиопию: 2015 г. (горный массив Арси), 2016 г. (горный массив Арси, национальный парк Борена), 2017 г. (национальный парк Борена, лес Ареро), 2018 г. (горный массив Чоке, истоки Голубого Нила). Обработка материала, дальнейший молекулярно-генетический, филогенетический и цитогенетический анализы проводились при непосредственном участии автора на базе Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и Института биологии позвоночных Чешской Академии Наук. Обработка полученных данных, их визуализация и интерпретация выполнены автором лично. Все опубликованные по теме диссертации работы написаны при непосредственном участии автора, доля автора в подготовке публикаций составила 30-80%.

Степень достоверности и апробация результатов. В исследовании использованы общепринятые методы сбора материала и анализа результатов. Статьи, опубликованные по теме диссертации, прошли рецензирование ведущими отечественными и зарубежными специалистами в области эволюционной биологии. Результаты работы были представлены на международной конференции «Структура вида у млекопитающих» (21-23 октября 2015 г., Москва, Россия); международной конференции «Териофауна России и сопредельных территорий» (1-5 февраля 2016 г., Москва, Россия); VII молодежной школе-конференции молодых сотрудников и аспирантов «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (27-28 октября 2016 г., Москва, Россия); рабочем совещании «Hybrid Zone Workshop» (4-6 сентября 2017 г., Мохельно Млын, Чешская республика); III международной конференции «Современные проблемы биологической эволюции» (16-20 октября 2017 г., Москва, Россия) а также на лабораторных коллоквиумах ИПЭЭ РАН и ИБР РАН в 2015-2018 гг.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 133 источника из которых 126 - на иностранном языке. Общий объем диссертации: 130 страниц машинописного текста. Работа содержит 4 таблицы и 21 рисунок. Приложения представлены на 18 страницах и содержат 5 таблиц.

Благодарности. Исследования, положенные в основу диссертации, проводились при поддержке грантов РФФИ (14-04-00751, 15-04-03801 и 18-04-00563).

Я бесконечно признателен своим научным руководителям д.б.н. **Лавренченко Л.А.** и д.б.н. **Баклушинской И.Ю.** за всестороннюю поддержку и помощь на всех этапах

работы. При сборе материала, послужившим основой для данной работы, весомую помощь оказали члены экспедиционного отряда Совместной Российско-Эфиопской Биологической Экспедиции (СРЭБЭ) к.б.н. **Александров Д.Ю.**, **Громов А.Р.**, **Мартынов А.А.** и **Мохаммед Кассо**. Хочется подчеркнуть значительный вклад к.б.н. **Даркова А.А.** (СРЭБЭ), проф. **Афорка Бекеле** и **Меселе Йихуни** (Университет Аддис-Абебы) в обеспечение логистики полевых работ, а также **Чемыре Зевди** (Оромская природоохранная организация) при получении разрешений на работу в национальных парках Эфиопии. Хочется выразить самые теплые слова благодарности безвременно ушедшему к.б.н. **Потапову С.Г.** за терпеливое наставничество при освоении методов молекулярно-генетического анализа, а также за отдельные идеи, нашедшие применение в настоящем исследовании. Я признателен **Лебедеву В.С.** (Зоологический музей МГУ) и **Ондре Микуле** (Институт Биологии Позвоночных, Чехия) за помощь в освоении методов филогенетического анализа и ценные советы на всех этапах работы. Также приношу искреннюю благодарность проф. **Йозефу Брыйе** (Институт Биологии Позвоночных, Чехия) за плодотворное сотрудничество, результатом которого явилась данная работа. Автор признателен д.б.н. **Холодовой М.В.** и к.б.н. **Зиневич Л.С.** за критические советы и замечания при рецензировании работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** обоснована актуальность рассматриваемой темы, сформулирована цель и поставленные для ее решения задачи.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

В данной главе в четырех подглавах рассматриваются: феномен адаптивной интрогрессии, с обсуждением наиболее ярких публикаций, касающихся данной темы; физико-географическая характеристика Эфиопии; ее значимость для исследований в области видообразования и процессов микроэволюции, и, наконец, дается подробная характеристика рода узкоголовых крыс *Stenocephalemys*.

1.1. АДАПТИВНАЯ ИНТРОГРЕССИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ КАК ФЕНОМЕН МИКРОЭВОЛЮЦИИ.

Обзор современной литературы показывает, что феномен адаптивной интрогрессии, при котором заимствованный генетический материал оказывается «полезным» при адаптации к определенным условиям, имеет широкий спектр возможных последствий – от расширения ареала и/или экологической ниши вида до так называемого “эволюционного

спасения” – нивелирования негативного эффекта от накопившегося груза вредных мутаций. Отдельное внимание уделено процессам интрогрессии мтДНК, в связи с вовлечением кодируемых в ней генов в процесс клеточного дыхания. Несмотря на большое количество примеров интрогрессии, известных для разных групп млекопитающих, выявление ее адаптивного характера часто оказывается затруднительным. В данной главе обобщаются возможные методологические подходы, способствующие решению данного вопроса.

1.2. ФИЗИКО-ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФИОПИИ.

Территория Эфиопии представляет собой самый обширный комплекс горных местообитаний Африки (Freilich et al., 2014). Одним из основных геоморфологических особенностей страны является Большой Эфиопский Рифт, протягивающийся на более чем 600 км. от озера Туркана на западе страны до Афарского треугольника на востоке и являющийся частью Афро-Аравийской рифтовой системы. Большой Эфиопский Рифт возник в раннем миоцене в результате расхождения Африканской и Аравийской тектонических плит (Bonini et al., 2005). Основные горные массивы страны лежат по обе стороны от рифта, формируя северо-западное (Абиссинское) и юго-восточное (Сомалийское) плато. К северу от Большого Эфиопского Рифта находится еще одна уникальная геоморфологическая структура – каньон Голубого Нила. Северо-западное горное плато состоит из отдельных горных массивов, самый большой из которых – Симиен – представляет из себя огромный щитовой вулкан, возникший в миоцене. Среди горных хребтов массива, имеющих высоты 3000-3500 м над ур. моря выделяется вершина Рас-Дашен (4620 м над ур. моря) – самая высокая точка Эфиопии. Меньшее по размеру юго-восточное плато представлено горными массивами Черчер, Арси и Бале. Находящееся в горном массиве Бале плато Санетти, характеризующееся средними высотами 4050 м, является самым обширным афро-альпийским местообитанием страны.

1.3. ТЕРРИТОРИЯ ЭФИОПИИ КАК ПОЛИГОН ДЛЯ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Горные тропики значительно отличаются от остальных территорий земного шара благодаря существованию устойчивого в течение всего года высотного температурного градиента (Janzen, 1967). Такие условия создают предпосылки для течения эволюционного процесса в рамках так называемой градиентной модели видообразования (Лавренченко, 2011; Nossil, 2012), согласно которой диверсификация видов происходит вдоль экологически обусловленного градиента условий окружающей среды, в результате чего процесс видообразования становится возможным даже при отсутствии физических преград

между возникающими формами. Несмотря на достаточную теоретическую разработанность гипотезы градиентного видообразования, число групп организмов, диверсификацию которых можно трактовать в рамках данной модели, относительно невелико.

Наличие большого количества экологических ниш на территории Эфиопского нагорья в сочетании с периодическими изменениями климата в плейстоцене способствовало адаптивной радиации видов и формированию “букетов” родственных форм. При этом их эволюционные истории оказывались достаточно сложными, ввиду наличия не только дивергентной, но также и ретикулярной составляющей (Lavrenchenko et al., 2004). Предполагается, что межвидовая гибридизация с последующей интрогрессией могла способствовать заимствованию генетического материала других видов, уже сформировавших адаптации к условиям высокогорья.

1.4. УЗКОГОЛОВЫЕ КРЫСЫ РОДА *STENOCEPHALEMYS*.

Представители рода узкоголовых крыс *Stenocephalemys* представляют собой пример ярко выраженной морфологической адаптации к обитанию в суровых условиях афро-альпийских высокогорий. Согласно последним таксономическим сводкам (Yalden, 2013; Monajem et al., 2015) в состав рода входит четыре вида: *S. albocaudata*, *S. griseicauda*, *S. albipes*, *S. ruppi*. Кроме этого, проведенные ранее цитогенетический и молекулярно-генетический анализы предполагают существование еще одной формы, предположительно видового ранга *Stenocephalemys* sp. A (Лавренченко, Верхейен, 2006). Сравнительная характеристика видов узкоголовых крыс представлена в таблице 1. Ареалы распространения и высотные пределы даны по: Lavrenchenko, Bekele, 2017.

Ранние исследования этой группы (Лавренченко, Верхейен, 2006) с использованием данных по мтДНК выявили филогенетический паттерн, при котором сестринскими оказываются афро-альпийские виды (*S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. A) и виды, населяющие местообитания более низких высот (*S. albipes* и *S. griseicauda*). Полученный результат не согласуется с предположением о течении эволюции данной группы согласно модели градиентного видообразования (Лавренченко, 2011). В то же время представляется, что проведение анализа с использованием не только митохондриальных, но также и ядерных маркеров, позволит пересмотреть отдельные положения ранних исследований.

Таблица 1. Характеристика видов *Stenocephalemys*.

Название вида	Ареал распространения	Высотные пределы
<i>S. albocaudata</i> (Frick, 1914)	афро-альпийские области юго-восточного плато	3000-4100 м над ур. моря
<i>S. griseicauda</i> (Peter, 1972)	высокогорные области северо-западного и юго-восточного плато	2400-4000 м над ур. моря
<i>S. albipes</i> (Rüppell, 1842)	горные леса северо-западного и юго-восточного плато	1500-3300 м над ур. моря
<i>S. ruppi</i> (Van der Straeten, Dieterlen, 1983)	гора Гуге (юго-запад страны, западный борт Рифтовой долины)	2800-3200 м над ур. моря
<i>Stenocephalemys</i> sp. A (Лавренченко, Верхейен, 2006)	афро-альпийские и высокогорные области северо-западного и юго-восточного плато	3800 м над ур. моря

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Материалом для исследования послужили пробы, собранные во время работы Совместной Российско-Эфиопской Биологической Экспедиции (СРЭБЭ) в 1995-2018 гг., а также в рамках экспедиций, организованных Институтом биологии позвоночных

Академии Наук Чешской Республики (Брно, Чехия). В работе были использованы пробы от 360 экз. *Stenocephalemys* генотипированных с использованием хотя бы одного маркера из 45 локалитетов с территории Эфиопии, включая все основные местообитания узкоголовых крыс (Рис. 1).

Молекулярно-генетический анализ был выполнен на базе лаборатории микроэволюции млекопитающих ИПЭЭ РАН им А.Н. Северцова и Института биологии позвоночных Академии Наук Чешской Республики. Основу анализа составили

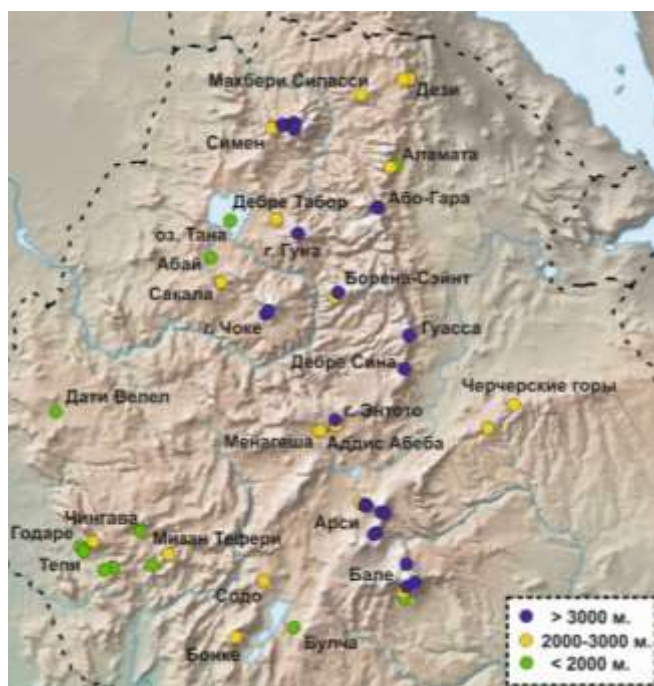


Рисунок 1. Карта локалитетов сбора образцов.

последовательности, полученные при секвенировании митохондриального маркера гена *CYTB*, а также шести ядерных маркеров (*IRBP*, *RAG1*, *WLS-7*, *DHCR24-7*, *SMO-9*, *NadSyn1-4*). Последовательности праймеров и протоколы PCR-амплификации были взяты из работ Лавренченко, Верхейен, 2006; Stanhope et al., 1992; Teeling et al., 2000; Rodríguez-Prieto et al., 2014.

Реконструкция филогенетических отношений на основе последовательностей митохондриального гена *CYTB* была произведена с использованием алгоритмов максимального правдоподобия (ML) и байесова анализа (BI). ML анализ был выполнен с использованием программы Treefinder v.03.2011 (Jobb, 2011), BI анализ - MrBayes v. 3.2.6. (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Уровень дивергенции митохондриальных линий был оценен с помощью генетических дистанций, вычисленных в Mega X (Kumar et al., 2018); сеть митохондриальных гаплотипов построена с помощью программы PopArt (Leigh, Bryant, 2015). Ядерная филогения была реконструирована в рамках концепции построения видового дерева в *BEAST (Bouckaert et al., 2014), в отличие от традиционных методов филогенетического анализа, учитывающей неполную сортировку линий. Оценка возраста узлов дивергенции на филогенетическом дереве также была выполнена в *BEAST. В анализ была введена внешняя группа в виде травяной мыши Блэйка *Arvicanthis blicki*, что позволило использовать возраст дивергенции Arvicanthini / Praomyini (Aghová et al., 2018) для калибровки полученного нами дерева. Все виды анализа были выполнены в соответствии с методическими рекомендациями авторов программ и применением соответствующих методов оценки достоверности получаемых результатов.

Анализ полных митохондриальных геномов был выполнен на базе Института биологии позвоночных Академии Наук Чешской Республики.

Сравнительный анализ нуклеотидных замен в гене цитохрома b в разных группах грызунов. В рамках исследования был проведен поиск возможных молекулярных адаптаций к условиям гипотермии в митохондриальном гене *CYTB*. Для верификации гипотезы об адаптивном значении обнаруженной мутации был выполнен сравнительный анализ имеющихся в базе данных GenBank последовательностей гена *CYTB* среди представителей трибы Praomyini, семейств и подсемейств Cricetinae, Murinae, Sciuridae и Sigmodontinae.

Цитогенетический анализ. Карiotипирование с использованием рутинной окраски по стандартной методике (Ford, Hamerton, 1956) было выполнено для всех видов *Stenocephalemys* с целью сравнения полученных результатов с уже имеющимися данными по отдельным популяциям, а также выявления возможной хромосомной изменчивости.

Кроме этого, цитогенетический анализ был использован при индивидуальном определении особей из смешанной популяции *S. albocaudata* – *S. griseicauda* из горного массива Арси, с целью поиска возможных следов современной гибридизации между этими видами.

Моделирование исторического распределения афро-альпийских местообитаний было произведено в среде R на основе базы данных WorldClim. Визуализация современного распределения афро-альпийских местообитаний была выполнена на основе данных из “Potential natural vegetation map of eastern Africa” (van Breugel et al., 2015).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Реконструкция филогенетических отношений на основе последовательностей гена цитохрома *b*. Полученная реконструкция филогенетических отношений в роде *Stenocephalemys* (Рис. 2) в целом, соответствует опубликованному ранее. В тоже время, использование расширенных выборок позволило выявить новые детали филогенетических отношений между видами рода. Для видов, характеризующихся относительно узким ареалом – *S. albocaudata* и *S. griseicauda* – показан незначительный уровень генетической изменчивости. При этом в обоих случаях четко прослеживается географическая структура, при которой первое деление на подклады разделяет популяции с разных плато. Наиболее разнообразной оказалась клада *S. albipes*, в составе которой было выявлено три глубоко дивергировавших линии. Популяции узкоспециализированных афро-альпийских видов *S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. A, напротив, характеризуются относительно низким гаплотипическим разнообразием. При этом множество гаплотипов отличаются друг от друга на одну-две замены, что позволяет предполагать прохождение популяций этих видов через «бутылочное горлышко» и последующее формирование практически всего современного разнообразия митохондриальной изменчивости на основе единичных гаплотипов.

Анализ медианой сети гаплотипов, имеющихся в митохондриальной кладе *albipes* (Рис. 3) показал, что основные гаплогруппы обособляют популяции с разных географических блоков страны: центральную – *albipes_1* и северную – *albipes_3*. В свою очередь, гаплогруппа *albipes_1* достоверно разделяется на четыре отдельных кластера, соответствующих разным регионам страны (Рис. 3). Митохондриальные гаплотипы *albipes_2*, обнаруженные в популяции из леса Чингава, обнаружили сходство с последовательностью, полученной при секвенировании музейного паратипа *S. rupp*. Генетические нескорректированные *p*-расстояния внутри каждой из обозначенных клад не

превышают значения 0,01, в то время как дистанции между отдельными кладами на порядок больше, с максимальным значением 0,099 между кладами *albocaudata_2* и *albipes_1a*.

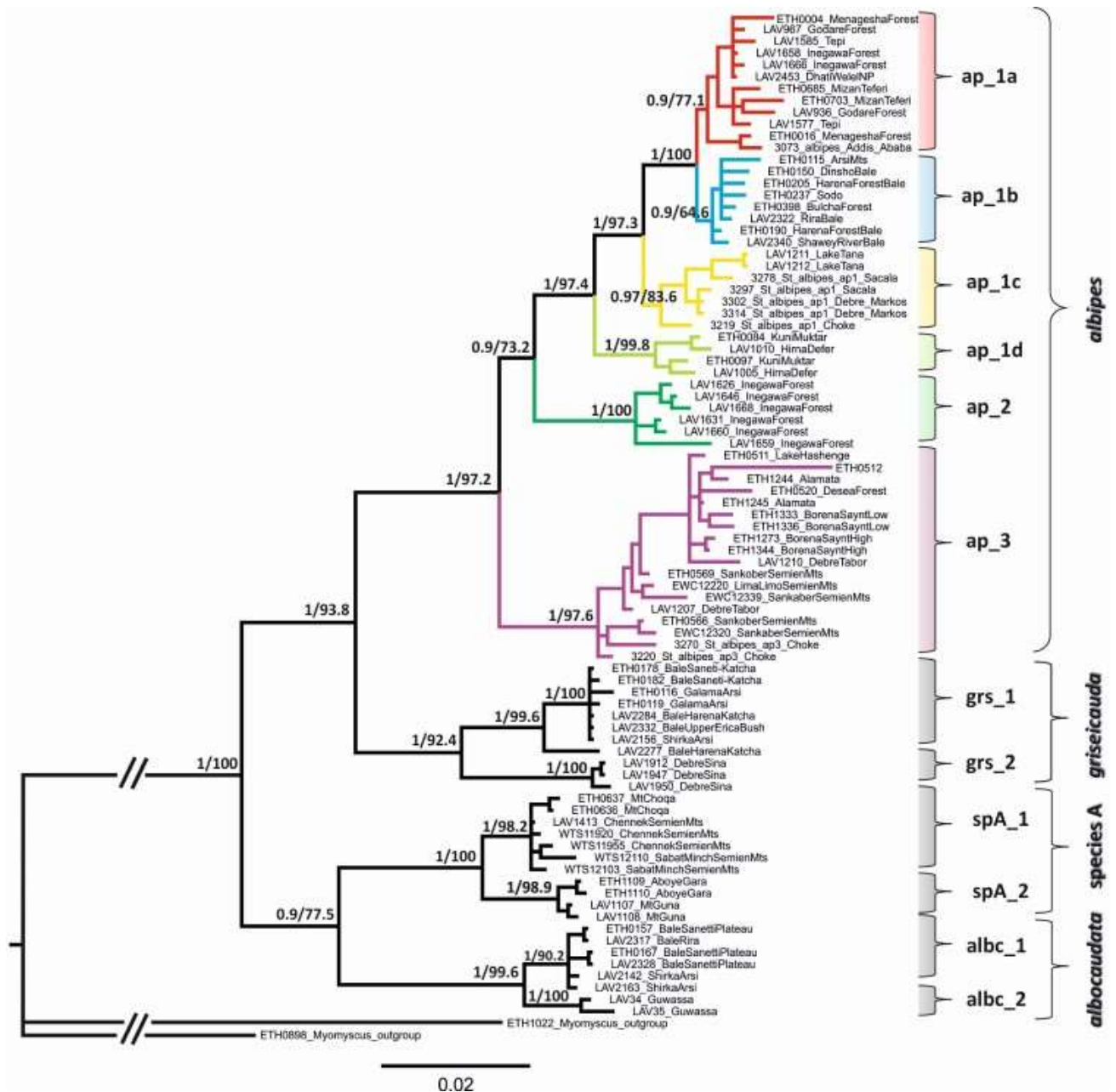


Рисунок 2. Реконструкция филогенетических отношений в роде *Steppocerphalemys* на основе последовательностей *cytb* мтДНК. Цифровые значения у узлов обозначают постериорные вероятности VI и бутстреп-поддержки ML.

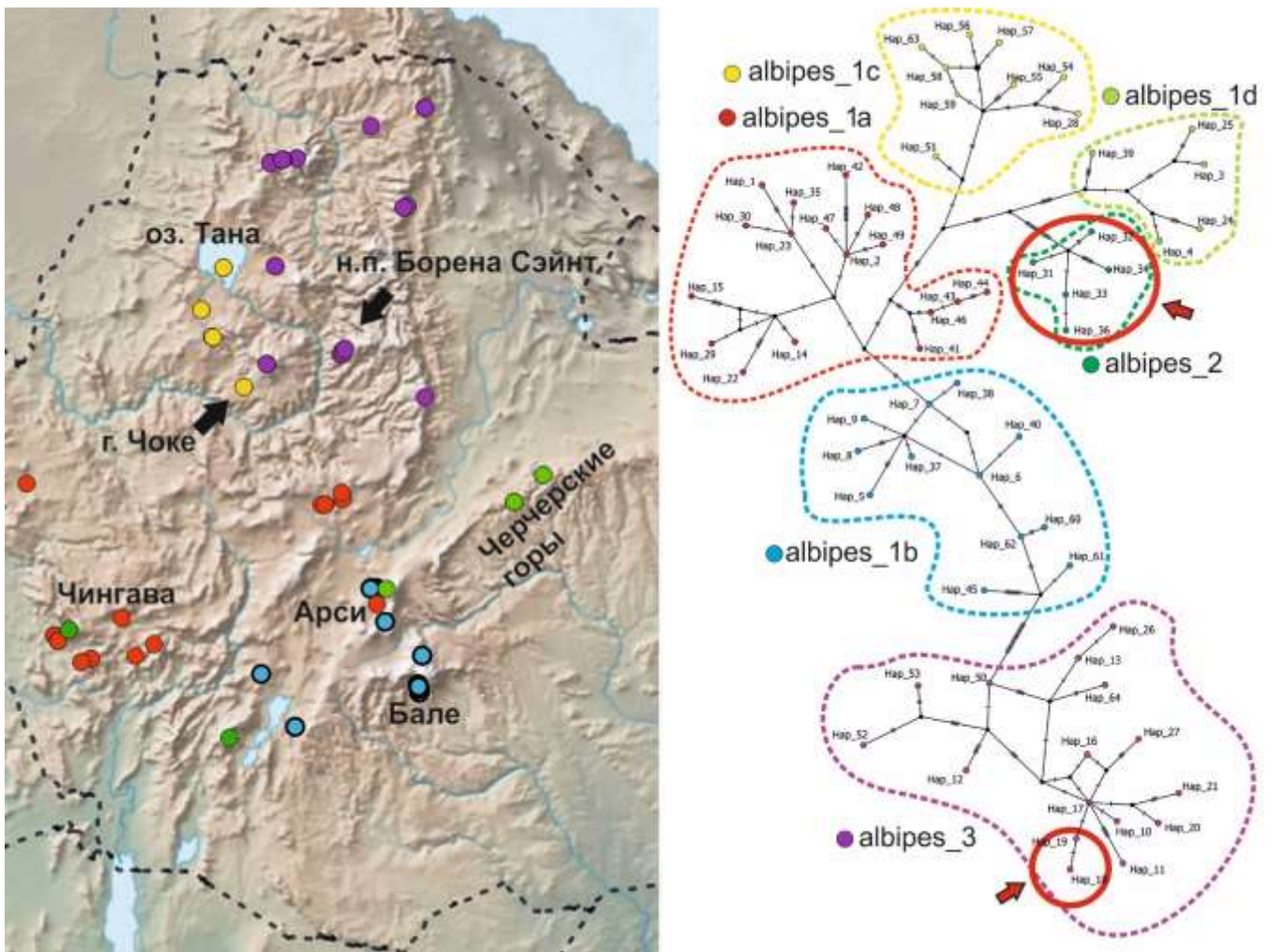


Рисунок 3. Медианная сеть гаплотипов митохондриальной клады “albipes” и их распределение по территории Эфиопии. Красными кругами обозначены гаплотипы, интрогрессированные к другим видам *Stenocephalemys*: гаплогруппа *albipes_2* представлена особями *S. cf. gurri*, гаплотипы *H_18* и *H_19*, входящие в гаплогруппу *albipes_3*, обнаружены в популяции «*pseudogriseicauda*» (подробности см. ниже).

Анализ ядерных маркеров. При построении филогенетической реконструкции на основе ядерных маркеров был использован алгоритм видового дерева, реализованный в программе *BEAST, требующий отнесения включенных в анализ последовательностей к определенным «видам». За основу такого разделения были взяты результаты, полученные при анализе митохондриальной филогении, согласно которым внутри рода было выделено 9 основных линий. Предварительный анализ ядерных маркеров на основе конкатенированных последовательностей установил, что популяции *S. albicaudata* с разных берегов рифта не обнаруживают различий в ядерном геноме, поэтому в окончательном анализе «видового дерева» они рассматривались в составе единой группы.

То же самое относится к митохондриальным линиям «настоящих» *S. albipes* (albipes_1 и albipes_3). В то же время, популяции *S. albipes* из национального парка Борена Сэйнт, не выделяющиеся при анализе митохондриальной филогении, по результатам предварительного анализа ядерных маркеров обнаружили существенные отличия и в окончательном анализе были отнесены к отдельной группе. Популяции *Stenocephalemys* sp. A, относящиеся к двум основным митохондриальным подкладам (spA_1 и spA_2), обнаружили различия по результатам цитогенетического анализа, и, при анализе ядерных маркеров рассматривались как две независимые единицы. Таким образом, итоговое видовое дерево *Stenocephalemys* включало в себя 8 групп: «albocaudata», «griseicauda_1», «griseicauda_2», «albipes_1-3», «albipes_2= *S. cf. ruppi*», «albipes Борена Сэйнт», «SpA_1», «SpA_2» (Рис. 4).

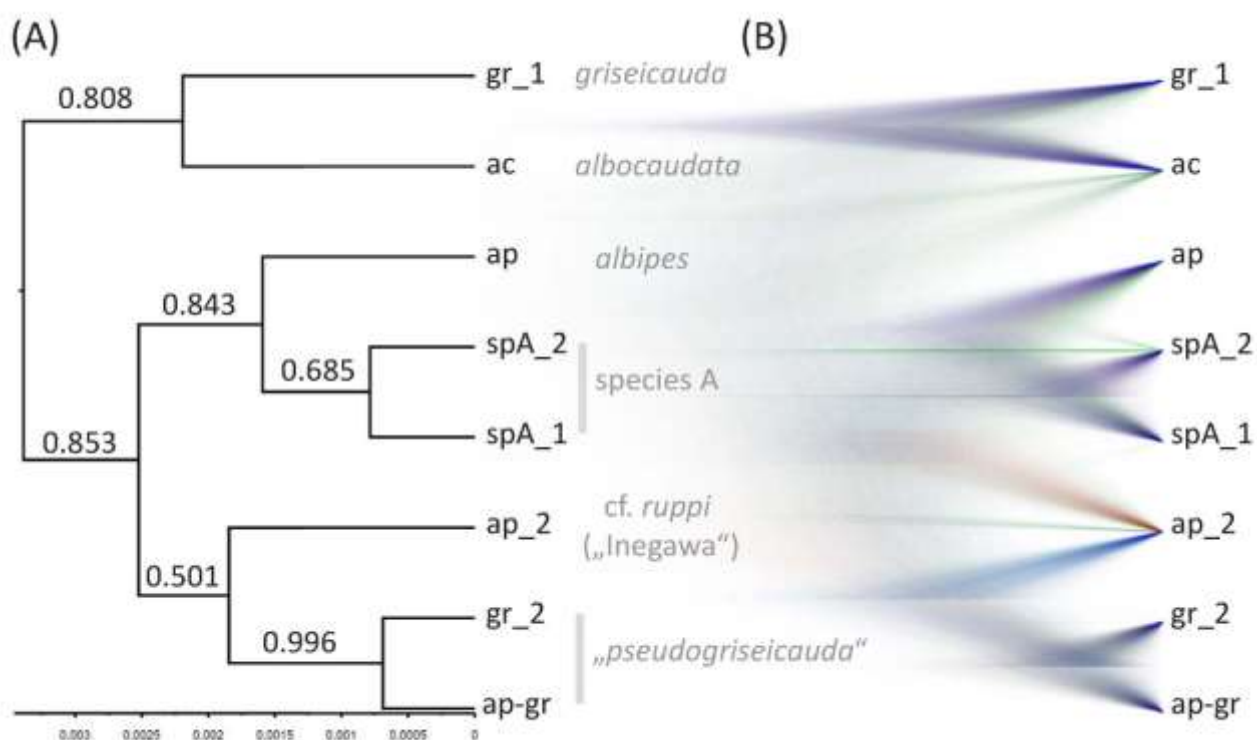


Рисунок 4. (А) Консенсусное видовое дерево *Stenocephalemys*, построенное на основе анализа 6 ядерных маркеров в *BEAST. (В) Визуализация 18.000 деревьев, полученных алгоритмом МСМС с помощью программы DensiTree.

Филогенетические реконструкции, выполненные на основе митохондриальных и ядерных маркеров, обнаружили значительные несоответствия. Так, топология видового дерева предполагает сестринские взаимоотношения между парами *S. albocaudata* - *S. griseicauda* и *Stenocephalemys* sp. A - *S. albipes*. Популяции *S. griseicauda* с северо-западного

плато, относящиеся к митохондриальной линии «griseicauda_2», не обнаруживают реципрокной монофилии с «настоящей» *S. griseicauda* юго-восточного плато, и в дальнейшем обозначаются нами как «pseudogriseicauda». Эта форма обнаруживает значительное сходство с группой «albipes_Борена Сэйтн», что также не согласуется с результатами митохондриальной филогении (Рис. 2, 3). Особи *S. albipes* из леса Чингава, несущие митохондриальную линию «albipes_2= *S. cf. ruppi*», отличаются от «настоящих» *S. albipes*, формируя общую группу вместе с «pseudogriseicauda», хотя и данный узел не поддерживается высокой поддержкой (Рис. 4).

Датировка узлов дивергенции видового дерева *Stenocephalemys* определила возраст базальной дивергенции рода серединой плейстоцена 1,03 (0,43-1,82) млн. лет. При этом точное определение временных рамок событий внутриродовой дивергенции не представляется возможным из-за значительной степени перекрытия доверительных интервалов (Рис. 5).

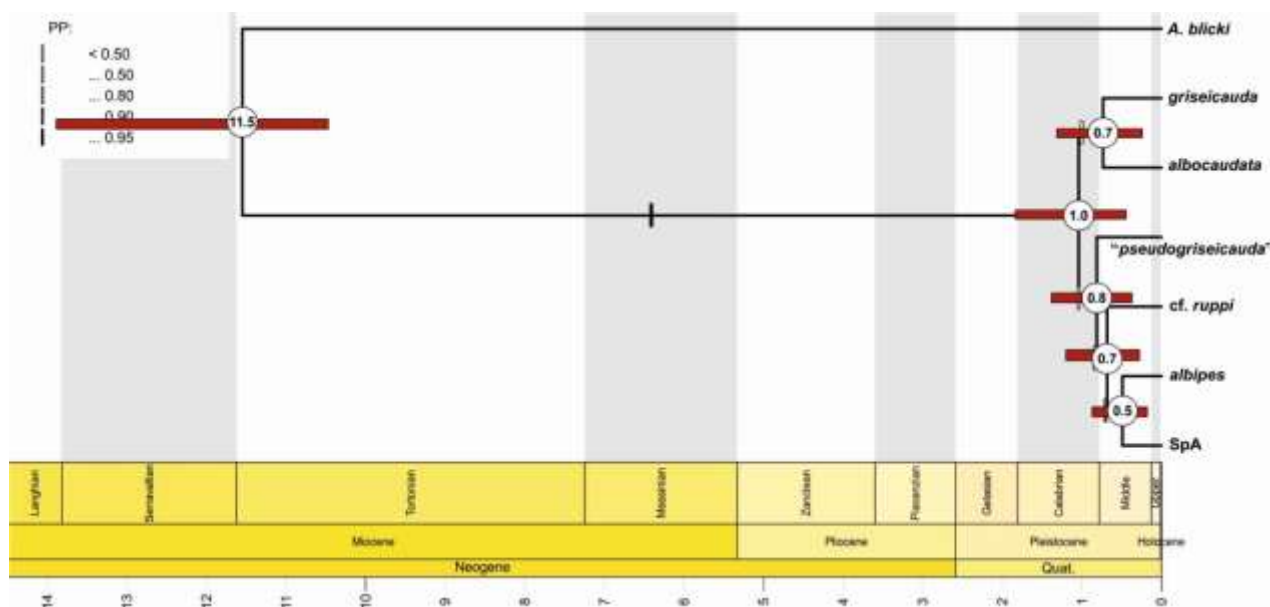


Рисунок 5. Временная датировка филогенетического дерева узкоголовых крыс *Stenocephalemys*.

Анализ полных митохондриальных геномов обнаружил топологию, соответствующую полученной на основе одного последовательностей *cytb* (Рис. 6).

Анализ распространения нуклеотидных замен в митохондриальном гене цитохрома *b* и их влияния на функцию белка. При сравнении аминокислотных последовательностей белка *cytb* у основных митохондриальных линий *Stenocephalemys* было обнаружено, что специализированные афро-альпийские виды *S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. А отличаются от остальных наличием замены в 18 позиции белка, имея

аминокислотный остаток лейцин (LEU) вместо фенилаланина (PHE), характерного для последовательностей *cytb* у остальных видов узкоголовых крыс.

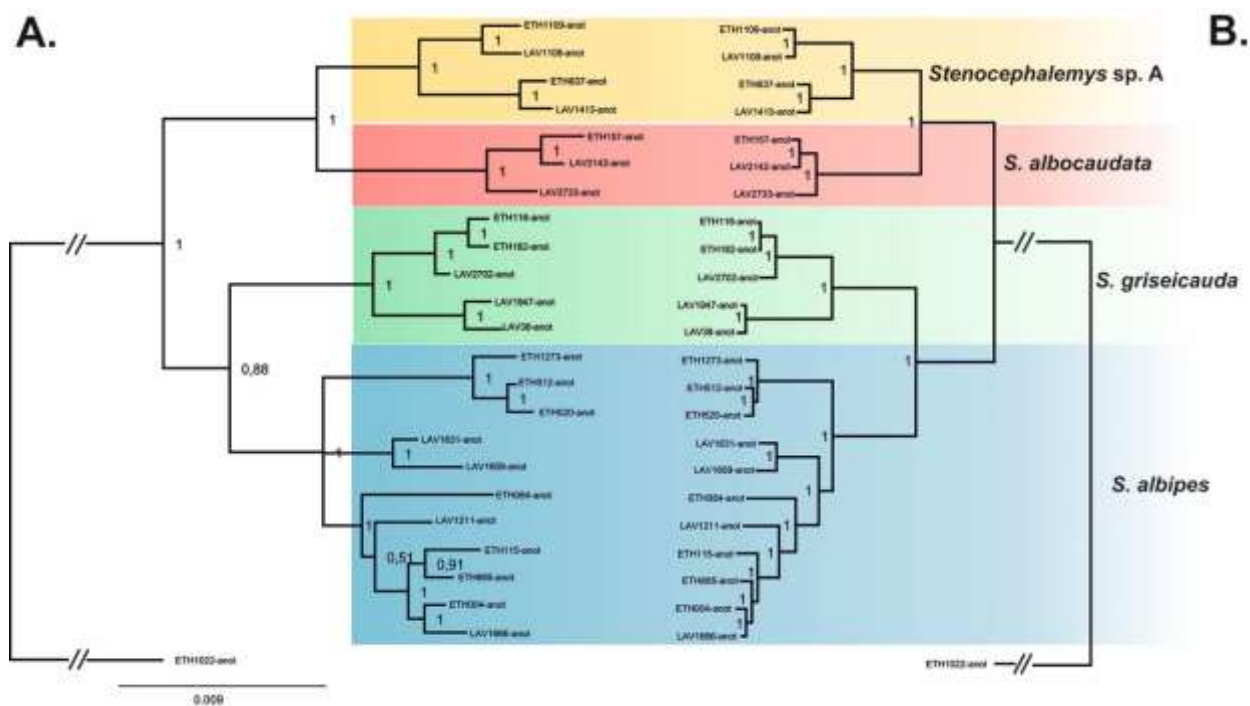


Рисунок 6. Филогенетические реконструкции митохондриальных линий *Stenocephalemys*, выполненные на основе последовательностей функциональных генов (12S рРНК, 16S рРНК и 22 тРНК) (А) и 12 белок-кодирующих генов (В) мтДНК. Цифровые значения у узлов обозначают постериорные вероятности *BI*.

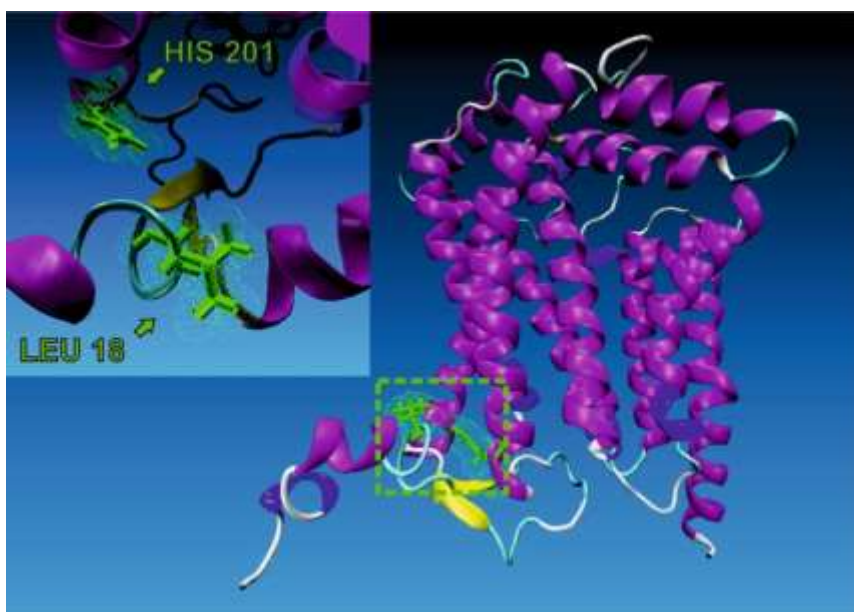


Рисунок 7. Модель трехмерной структуры белка *cytb*, полученная с использованием сервера I-TASSER по нуклеотидной последовательности *Stenocephalemys albicaudata*. Визуализация выполнена в программе VMD. Аминокислотные остатки LEU18 и HIS201, участвующие в присоединении молекулы убихинона, показаны зелеными стрелками.

Моделирование трехмерной структуры белка (Рис. 7) показало, что 18 позиция находится в непосредственной близости (10,8 Å) от позиции 201, выполняющей основную роль в присоединении молекулы убихинона (Kolling et al., 2003). Анализ степени распространения данной мутации среди 34 видов из 8 родов, входящих в трибу Praomyini, не выявил случаев подобной замены. Включение в анализ последовательностей голарктических видов грызунов показало достаточную консервативность 18 позиции белка *cytb*. Так, сходная мутация была обнаружена лишь у альпийского сурка *Marmota marmota*. Среди представителей Sigmodontinae сходная мутация была выявлена для трех видов, населяющих высокогорья Анд на высотах от 4500 м над ур. моря (*Punomys kofordi*), и 2460-3650 м над ур. м (*Thomasomys oreas* и *T. gracilis*). В то же время остальные, населяющие более низкие местообитания виды, несут «типичный» аминокислотный остаток фенилаланин.

Цитогенетический анализ выявил соответствие полученных кариотипов таковым, известным для видов *Stenocephalemys* ранее. Кариотипирование особей «промежуточного» фенотипического облика из смешанной популяции *S. albocaudata* – *S. griseicauda* не выявило каких-либо изменений в их кариотипах, что позволяет предполагать отсутствие случаев современной гибридизации между сестринскими видами.

ГЛАВА 7. ОБСУЖДЕНИЕ

Использование расширенных выборок, а также применение мультилокусного анализа, позволило значительно дополнить существующие представления о распространении видов *Stenocephalemys*. Так, впервые было показано, что ареал узкоспециализированного обитателя афро-альпийских высокогорий *S. albocaudata* не ограничивается исключительно массивами юго-восточного плато, но и охватывает отдельные массивы на противоположенном берегу рифта. Замещающий его в поясе верещатника *S. griseicauda* также характерен только лишь для юго-восточного плато и отдельных массивов южной части северо-западного плато. Популяции с территорией северо-западного плато, несущие мтДНК, схожую с *S. griseicauda*, и ранее относимые в состав этого вида, по всей видимости относятся к самостоятельной форме, предположительно видового ранга, обозначенной в данной работе как «*pseudogriseicauda*».

Сопоставление результатов филогенетических реконструкций, выполненных на основе митохондриальных и ядерных генов выявило ряд несоответствий, позволяющих предположить, что эволюция узкоголовых крыс включала не только дивергентные, но и, по всей видимости, разновременные ретикулярные процессы. Основываясь на результате, полученном при анализе ядерных маркеров, можно выдвинуть предположение, что первый

этап внутривидовой дивергенции заключался в разделении единого ареала предковой для всех *Stenocephalemys* формы на две популяции на разных берегах рифта (Рис. 8 А). Вероятно, это произошло во времена плейстоценовых межледниковий, когда границы поясов высотной зональности смещались вверх, вследствие чего вся территория Большого Эфиопского Рифта оказывалась непригодной для обитания узкоголовых крыс.

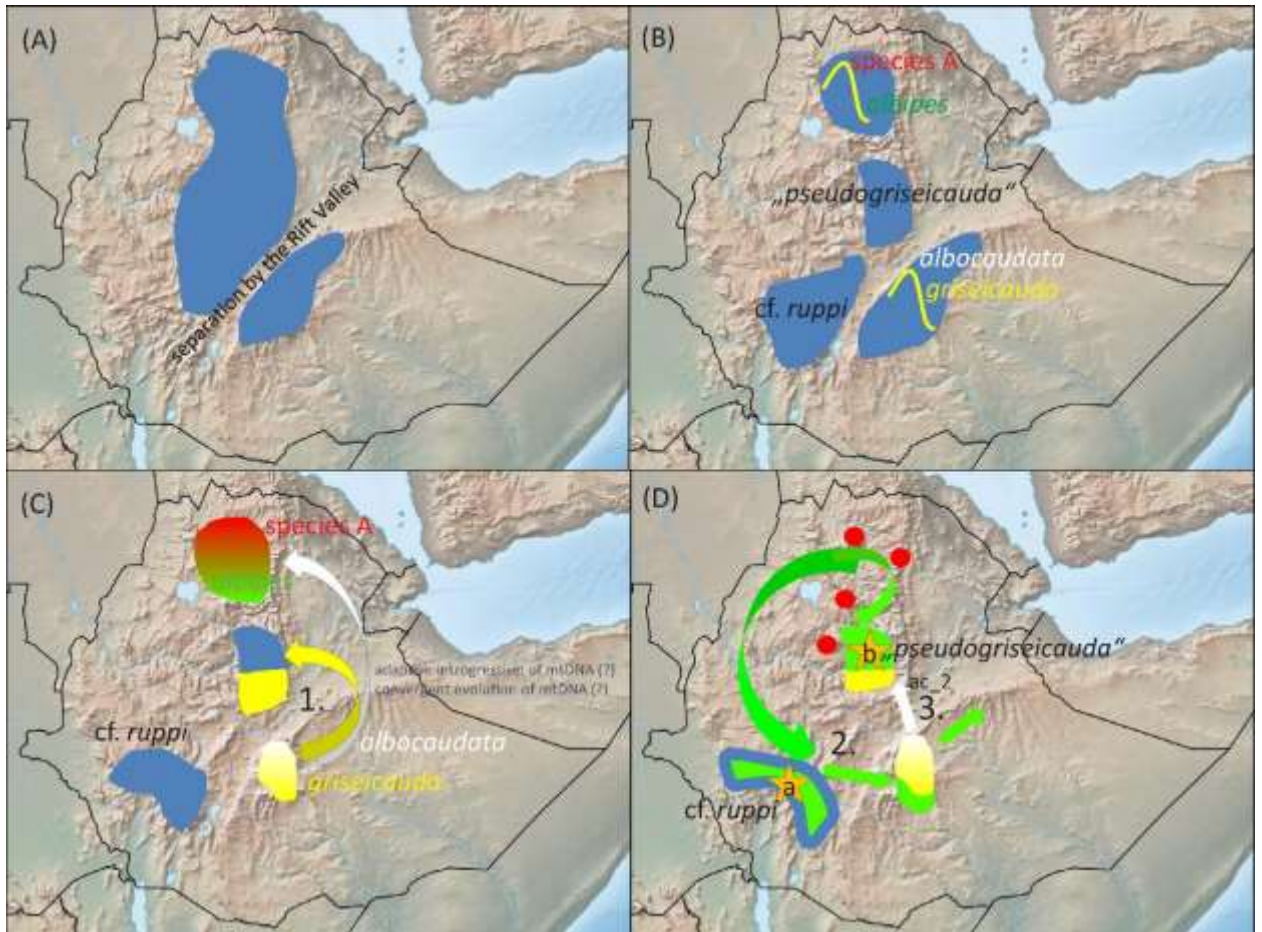


Рисунок 8. Схематичное изображение предполагаемого сценария эволюции *Stenocephalemys*. (А) Разделение единой популяции предковой для рода формы. (В) Последующая фрагментация популяций и схематичное изображение предполагаемых случаев градиентного видообразования по обе стороны от Рифтовой долины. (С) Пересечение Рифтовой долины (1) с последующей гибридизацией предковых форм “albicaudata” с “sp. A” и “griseicauda” с “pseudogriseicauda”. (D) Экспансия клады “albipes” по территории Эфиопии с гибридизацией с *S. cf. ruppi* (оранжевая звезда “a”) и *S. “pseudogriseicauda”* (оранжевая звезда “b”), с последующим пересечением Рифтовой долины (2). Красные точки обозначают современное распределение популяций *Stenocephalemys sp. A*; белая стрелка – относительно недавнее пересечение Рифтовой долины (3) *S. albicaudata*, предположительно в период последнего ледникового максимума.

Дальнейшее сокращение ареалов вызывало их фрагментацию (Рис. 8 В), и диверсификацию пар *S. albocaudata* – *S. griseicauda* и *Stenocephalemys* sp. А – *S. albipes*. Поскольку в обоих случаях образование новых видов происходило вдоль выраженного высотного градиента, есть основания предполагать соответствие этого процесса градиентной (экологической) модели. Затем, во времена оледенений, границы поясов высотной зональности смещались вниз, формируя «коридоры», через ранее непреодолимые барьеры. Это могло способствовать возникновению вторичных контактов между популяциями с разных берегов рифта и гибридизации между формами, еще не успевшими полностью сформировать изолирующие барьеры (Рис. 8 С). В то же время, учитывая более быстрый темп накопления мутаций в мтДНК, связанный, с одной стороны, с меньшим эффективным размером популяции, а с другой, с возможным давлением отбора в сторону адаптации к гипотермии, можно предположить разную степень адаптации митохондриальных геномов разных популяций к существующим условиям. Вследствие этого, в результате гибридизации могла происходить интрогрессия чужеродной мтДНК, с полным замещением видоспецифичной в случае адаптивного преимущества первой. Альтернативный сценарий, с помощью которого можно объяснить подобный паттерн – конвергентная эволюция белок-кодирующих последовательностей мтДНК – представляется менее правдоподобным, поскольку филогенетическая реконструкция, выполненная на основе полных последовательностей мтДНК, обнаруживает сходство с таковой, полученной для всех образцов по одному митохондриальному маркеру *cytb*.

Распространение лесов в теплые периоды межледниковий способствовало расселению *S. albipes* по территории Эфиопии. На пути своей экспансии популяции этого вида вероятно могли сталкиваться с популяциями *S. cf. ruppi* и “*pseudogriseicauda*”, что оставило след в митохондриальных геномах последних. Так, гибридизация и последующая интрогрессия с полным замещением исходного митохондриального генома в случае *S. cf. ruppi*, вероятно, датируется более древним возрастом, поскольку митохондриальные гаплотипы *S. cf. ruppi*, несмотря на очевидное родство с *S. albipes*, отличаются от всех современных гаплотипов этого вида. Интрогрессия мтДНК в популяцию “*pseudogriseicauda*” в национальном парке Борена Сэнт предполагает значительно более молодой возраст, поскольку интрогрессированные гаплотипы (Н_18 и Н_19) практически идентичны таковым, характерным для *S. albipes*, населяющих эту территорию (Рис. 3).

Сравнение аминокислотных последовательностей гена *cytb* выявило сходные мутации, предположительно адаптивного характера, у пары неродственных афро-альпийских видов *S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. А. В целом это согласуется с предположением об общности происхождения их митохондриальных геномов в результате

древней интрогрессии. Однако, поскольку у рассматриваемых видов аминокислотный остаток лейцин кодируется триплетами, различающимися по двум нуклеотидам (ТГА и СТС), наиболее вероятным представляется сценарий, согласно которому данная аминокислотная замена произошла независимо в обеих линиях. В пользу этого косвенно свидетельствует пример обнаружения подобной аминокислотной замены у неотропических хомячков подсемейства *Sigmodontinae*, населяющих высокогорья Анд. Таким образом, можно предполагать, что процесс адаптации узкоголовых крыс к условиям гипотермии на афро-альпийских высокогорьях характеризовался сочетанием интрогрессии и последующей конвергентной «доработки» геномов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционно считается, что появление современного разнообразия видов в немалой степени связано с плейстоценовыми рефугиумами, в которых популяции могли переживать неблагоприятные условия и, вследствие изоляции, накапливать изменения, способствующие их дальнейшей диверсификации (Stewart, Lister, 2001; Peterson, Nyari, 2008). В то же время, существует альтернативная гипотеза так называемого *градиентного* видообразования (Nosil, 2012), согласно которой «триггером» процесса диверсификации может являться экологически обусловленное разнонаправленное давление отбора, в результате чего инициация процесса видообразования может происходить и при существующем обмене генов. Обнаруженный нами паттерн сестринских взаимоотношений между отдельными видами *Stenocephalemys* позволяет предположить, что их эволюция шла согласно модели градиентного видообразования, что делает узкоголовых крыс первой и единственной группой грызунов Эфиопского нагорья, эволюцию которой можно описать в рамках данной гипотезы.

Несмотря на традиционное противопоставление дивергентных и ретикулярных процессов, в последнее время накапливается все больше сведений о том, что обмен генетической информацией в результате гибридизации не только не препятствует видовой дивергенции, но и в отдельных случаях способствует эволюционному процессу, делая возможным освоение новых местообитаний или экологических ниш благодаря заимствованию отдельных участков генома (Arnold, 2004). Результаты нашего исследования позволили предположить, как древние случаи заимствования чужого митохондриального генома (в случае с парами *S. albocaudata* – *Stenocephalemys* sp. А и *S. griseicauda* – *S. albipes*), так и относительно более молодые (*S. albipes* – *S. ruppi* и *S. albipes* – *S. “pseudogriseicauda”*). Это позволяет заключить, что адаптивная радиация узкоголовых

крыс включала как дивергентные, так и одновременные ретикулярные процессы, связанные с интрогрессией мтДНК.

Проблема определения «адаптивности» определенных генетических сегментов представляет из себя достаточно нетривиальную задачу (Hedrick, 2013). Тем не менее, в отдельных случаях все же удастся соотнести обнаруживаемые различия с определенными биологическими функциями (Voratyński et al., 2014). Результаты нашего исследования показали, что крайне редкая для грызунов аминокислотная замена находится в непосредственной близости к активному центру митохондриального белка цитохрома *b*, и предположительно влияет на эффективность теплопродукции в митохондриях. В пользу адаптивности данного признака к условиям высокогорья свидетельствует его обнаружение у видов, населяющих высокогорья Африки и Южной Америки, а также, вероятно, независимое его появление у двух афро-альпийских видов *Stenocephalemys*.

ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования значительно расширили имеющиеся представления как о составе рода *Stenocephalemys*, так и о распространении отдельных видов. Обнаружена новая форма предположительно видового ранга *S.* «*pseudogriseicauda*». Впервые показано распространение *S. albocaudata* на северо-западном плато Эфиопского нагорья.
2. Выявлено несоответствие филогенетических деревьев, полученных с использованием митохондриальных и ядерных маркеров, что может быть интерпретировано как следствие одновременных событий межвидовой гибридизации с последующей интрогрессией.
3. Обнаруженный паттерн родственных связей между видами, замещающими друг друга вдоль высотного градиента, позволил предположить их диверсификацию согласно градиентной модели видообразования.
4. В результате обобщения полученных данных была предложена реконструкция эволюционной истории рода *Stenocephalemys*, включающая как дивергентные, так и ретикулярные процессы.
5. Показано наличие редкой для грызунов аминокислотной замены в белке цитохрома *b* у афро-альпийских видов *Stenocephalemys* и представителей Sigmodontinae, населяющих высокогорья Анд. Предположено её независимое появление в популяциях *S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. А, что представляет собой первый известный пример сочетания процессов интрогрессии и конвергентной молекулярной эволюции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации:

1. *Bryja J.* Reticulate Pleistocene evolution of Ethiopian rodent genus along remarkable altitudinal gradient / *Bryja J., Kostin D., Meheretu Y., Šumbera R., Bryjová A., Kasso M., Lavrenchenko, L.A.* // *Molecular phylogenetics and evolution.* – 2018. – V. 118. – P. 75-87.
2. *Kostin D.S.* Taxonomic and genetic diversity of rodents from the Arsi Mountains (Ethiopia) / *Kostin D.S., Kasso M., Komarova V.A., Martynov A.A., Gromov A.R., Alexandrov D.Y., Afework Bekele, Chemere Zewdie, Bryja J., Lavrenchenko L.A.* // *Mammalia.* – 2018. –doi 10.1515/mammalia-2017-0135, published online 31.08.2018.
3. *Костин Д.С.* Адаптация грызунов к обитанию в высокогорье: сочетание процессов митохондриальной интрогрессии и конвергентной молекулярной эволюции / *Костин Д.С., Лавренченко Л.А.* // *Доклады Академии Наук* – 2018. – Т. 483. № 3. – С. 345-348.

Материалы и тезисы конференций:

1. *Костин Д.С.* Генетические и экологические аспекты совместного обитания близких видов грызунов горного массива Арси (юго-восточная Эфиопия) / *Костин Д.С., Громов А.Р.* // «Образование, наука, инновации: вклад молодых исследователей». Выпуск 16: Материалы X (XLII) Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Кемерово; Изд-во КемГУ. – 2018. – С. 369–372.
2. *Костин Д.С.* Генетическая дифференциация и филогеография узкоголовых крыс рода *Stenocephalemys* / *Костин Д.С., Баклушинская И.Ю., Лавренченко Л.А.* // Структура вида у млекопитающих. Материалы конференции. –М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2016 – С. 48.
3. *Костин Д.С.* Сочетание дивергентных и ретикулярных процессов при эволюции видов рода *Stenocephalemys* / *Костин Д.С., Брыля Й., Лавренченко Л.А.* // Териофауна России и сопредельных территорий. Международное совещание (X Съезд Териологического общества при РАН) –М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2016 – С. 192.
4. *Костин Д.С.* Ретикулярная эволюция на выраженном высотном градиенте в горных тропиках (на примере узкоголовых крыс рода *Stenocephalemys*) / *Костин Д.С.,*

Бры́я Й., Лавренченко Л.А. // Генетика популяций: прогресс и перспективы. –М.: Ваш формат. – 2017 – С. 137-138.

5. **Костин Д.С.** Эволюция в горных тропиках как сочетание дивергентных и ретикулярных процессов / **Костин Д.С., Бры́я Й., Лавренченко Л.А. //** Современные проблемы биологической эволюции. Материалы III международной конференции. –М.: ГДМ. – 2017 – С. 78-80.