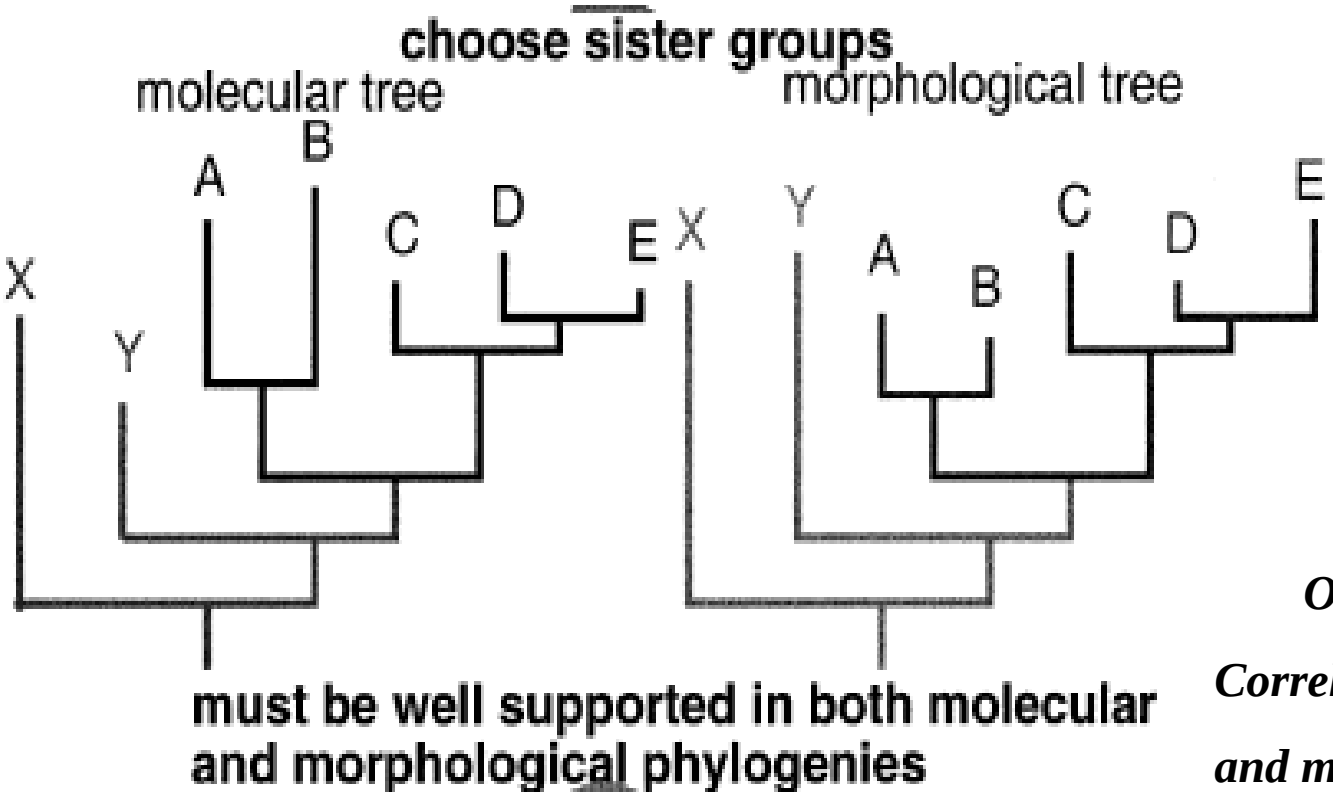
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук
г. Сыктывкар

Оценка морфологической и генетической изменчивости землероек (Soricidae) европейского северо-востока России

Д.М. Шадрин*, Я.И. Пылина, А.Н. Королев, Е.А. Порошин
shdima@ib.komisc.ru

Многие виды семейства Землеройковые (Insectivora, Soricidae) подразделены на ряд форм, отличающихся как по уровню, так и по качеству различий, в связи с чем возникают проблемы в определении структурированности вида и его границ. Поэтому, как отечественными, так и зарубежными исследователями все чаще изучается соотношение морфологической и генетической изменчивости, что, по мнению многих исследователей, является одной из основных задач современной эволюционной биологии.



Omland, K. E. 1997. Correlated rates of molecular and morphological evolution. Evolution 51:1381–1393.

Имеются сведения о том, что некоторые исследователи, изучая соотношения двух типов изменчивости разных таксономических групп, выявили значительную связь между уровнем молекулярных и морфологических различий, также имеется ряд работ в которых такой зависимости не обнаружено.

$$\boxed{M\Delta = \Gamma\Delta}$$

Castiglia, R., Makundi, R. & Corti, M. (2007) The origin of an unusual sex chromosome constitution in Acomys sp.(Rodentia, Muridae) from Tanzania. Genetica, 131, 201–207

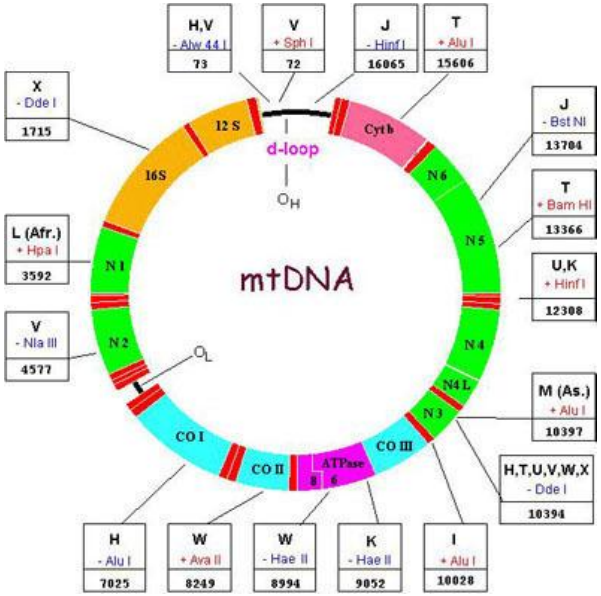
Conway Morris, S. 1998. The Crucible of Creation. The Burgess Shale and the Rise of Animals. 242 pp. Oxford University Press, Oxford.

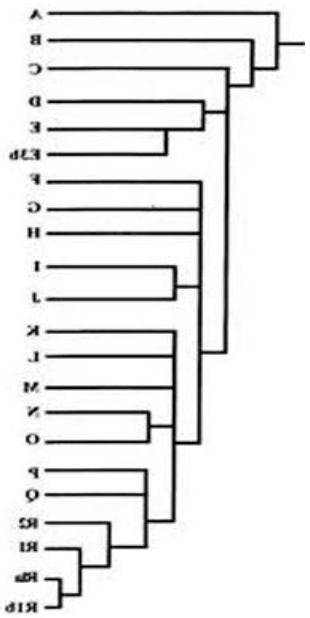
$$\boxed{M\Delta \neq \Gamma\Delta}$$

Bromham Testing The Relationship Between Morphological And Molecular Rates Of Change Along Phylogenies, 2002.

Молекулярно-генетические методы анализа:

- Сравнительный анализ последовательностей ДНК
- Фрагментный анализ (AFLP, ISSR, RAPD и др.)





Цель исследования – оценить морфометрическую и генетическую изменчивости представителей семейства Землеройковые европейского северо-востока России.

Задачи:

1) Собрать биоматериал пяти видов землероек (*Sorex minutus*, *S. caecutiens*, *S. araneus*, *S. isodon и Neomys fodiens*).
2) Методами геометрической морфометрии определить изменчивость исследуемых видов семейства Землеройковые.
3) Определить нуклеотидные последовательности гена *cytb* мтДНК исследуемых образцов и на их основании провести молекулярно-филогенетический анализ.
4) Сопоставить морфометрическую и генетическую изменчивости.

Объект исследования 46 образцов:

Sorex minutus (8)

Sorex caecutiens (12)

Sorex isodon (3)

Sorex araneus (10)

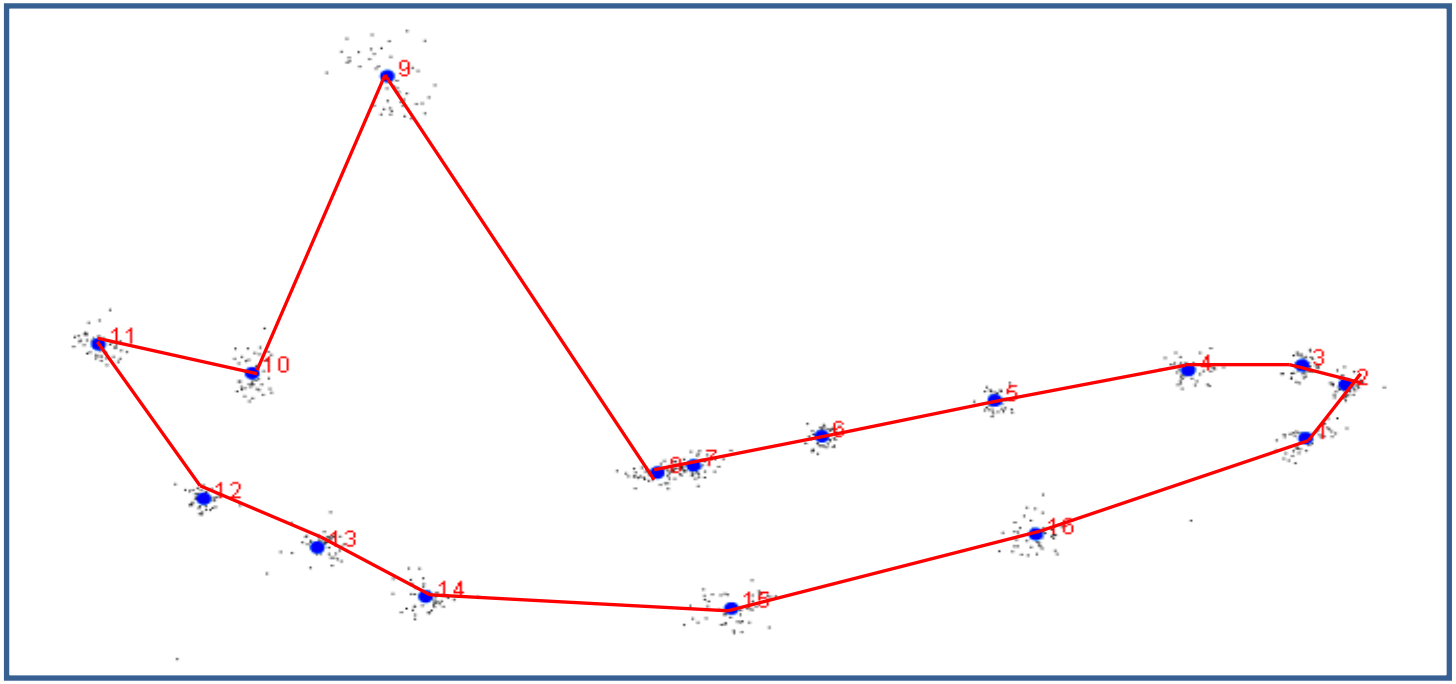
Neomys fodiens (13)

Отлов животных производился стандартным методом ловчих канавок 50 м длиной с 5 конусами, вкопанными с интервалом 10 м. Фиксация производилась по стандартной методике в 96% этиловом спирте.

Вид	№№ образцов	Год отлова	Место отлова
Sorex minutus	14, 16, 24, 32, 34, 38, 40, 41	2004	п. Пырский, Котласского района Архангельской области
S. caecutiens	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 42	1999-2001	п. Приозерный, Корткеросского района Республики Коми,
S. isodon	11, 12, 44	2008	с. Гам Усть-Вымского района Республики Коми,
S. araneus	13, 15, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 27, 28	2010	п. Пырский
Neomys fodiens	21, 22, 26, 29, 30, 31, 33, 35, 36, 37, 39, 43, 45	2010	п. Пырский

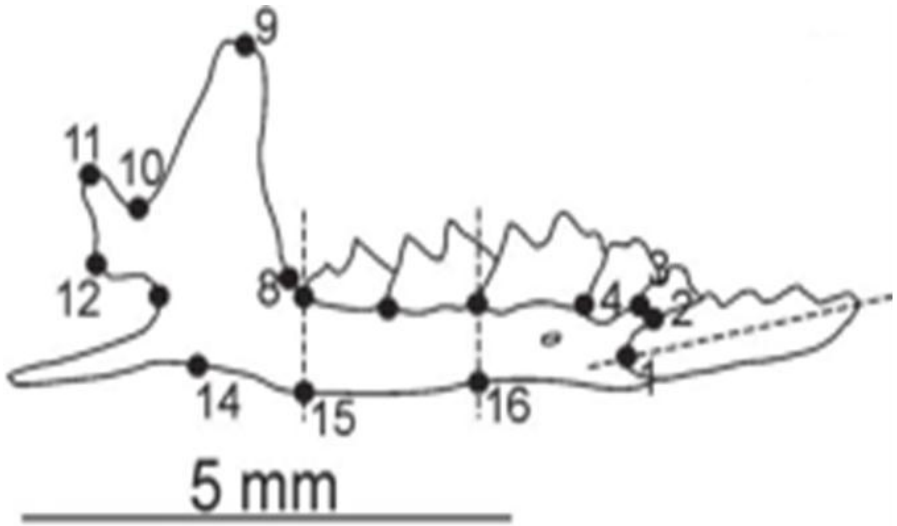
Методы исследования:

Геометрическая морфометрия - определяется как совокупность методов многомерного айген-анализа координат меток, описывающих конфигурацию морфологических объектов в пространстве форм. Она разрабатывалась как особый аналитический инструмент, позволяющий исключить влияние размеров на результаты анализа формы морфологических структур (Павлинов, 2001). Областью приложения геометрической морфометрии является некоторое множество форм.



Ключевым для формирования пространства структур (и производных от него пространств **прокрустовых** форм) являлся эталонный объект. Конфигурацией его меток задавали прокрустову метрику соответствующего пространства структур, на которое проецировали сравниваемые формы.

Нижнюю челюсть описывали совокупностью декартовых (x, y) координат 16 меток, нанесенных на сканированную поверхность нижней челюсти в программе tps-dig.



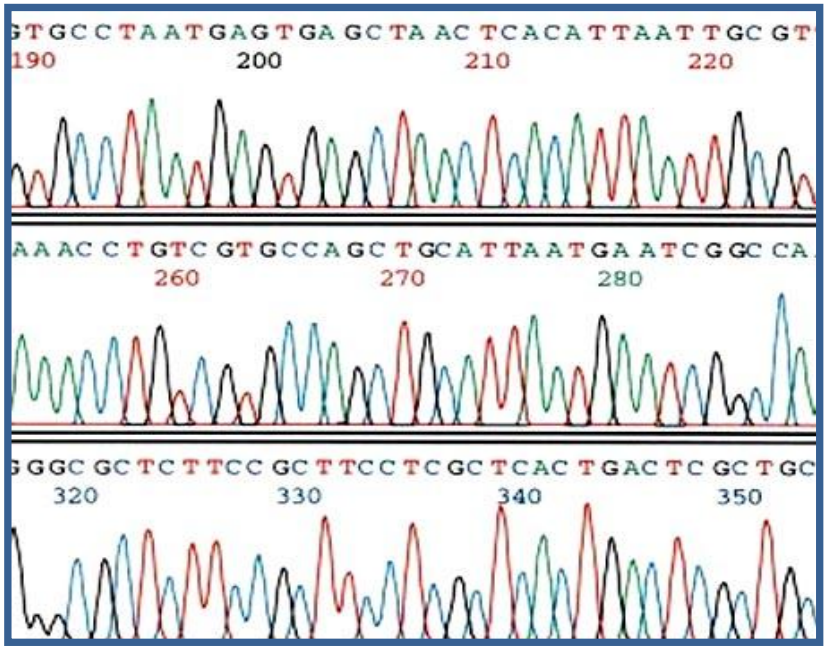
В качестве переменных использовали прокрустовы координаты (PrC), прокрустовы дистанции (PrD) и переменные формы (Relative Warps, RW). Каждую переменную рассчитывали стандартными методами с использованием программы MorphoJ.

Молекулярно-филогенетический анализ проводили с использованием последовательностей гена *cyt b* мтДНК длиной 1140 п.н. Определение последовательностей (секвенирование) проводили на базе ЦКП «Молекулярная биология» Института биологии, г. Сыктывкар.

Используемые праймеры для фрагмента cytb мтДНК:

L14734 5’ – AAAAACCATCGTTGTTATTCAACT – 3’

H15985 5’ – TAGAATGTCAGCTTTGGGTGCT – 3’

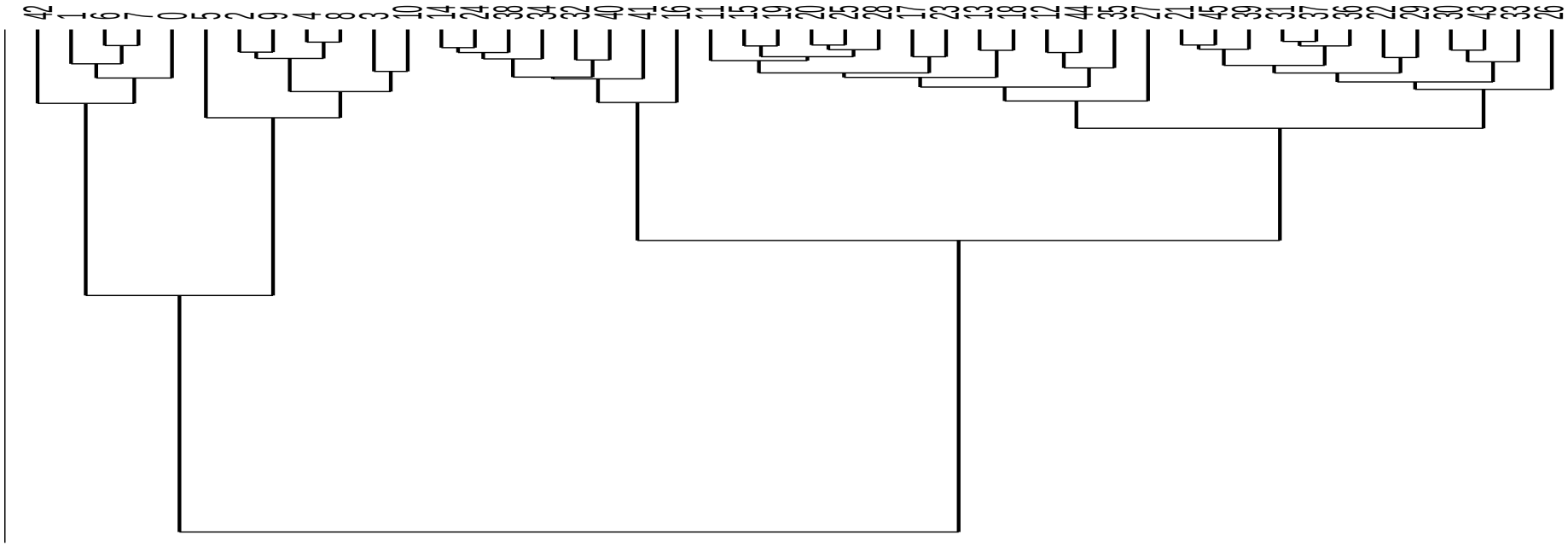


Выравнивание последовательностей проводили вручную и автоматически с помощью программы ClustalW филогенетический анализ осуществляли в программном пакете MEGA 5.0

Результаты

Дендрограмма, построенная на основе матрицы PrD, разделила массив данных без деления на группы по видам.

Sorex caecutiens *Sorex minutus* *Sorex isodon* *Sorex araneus* *Neomys fodiens*

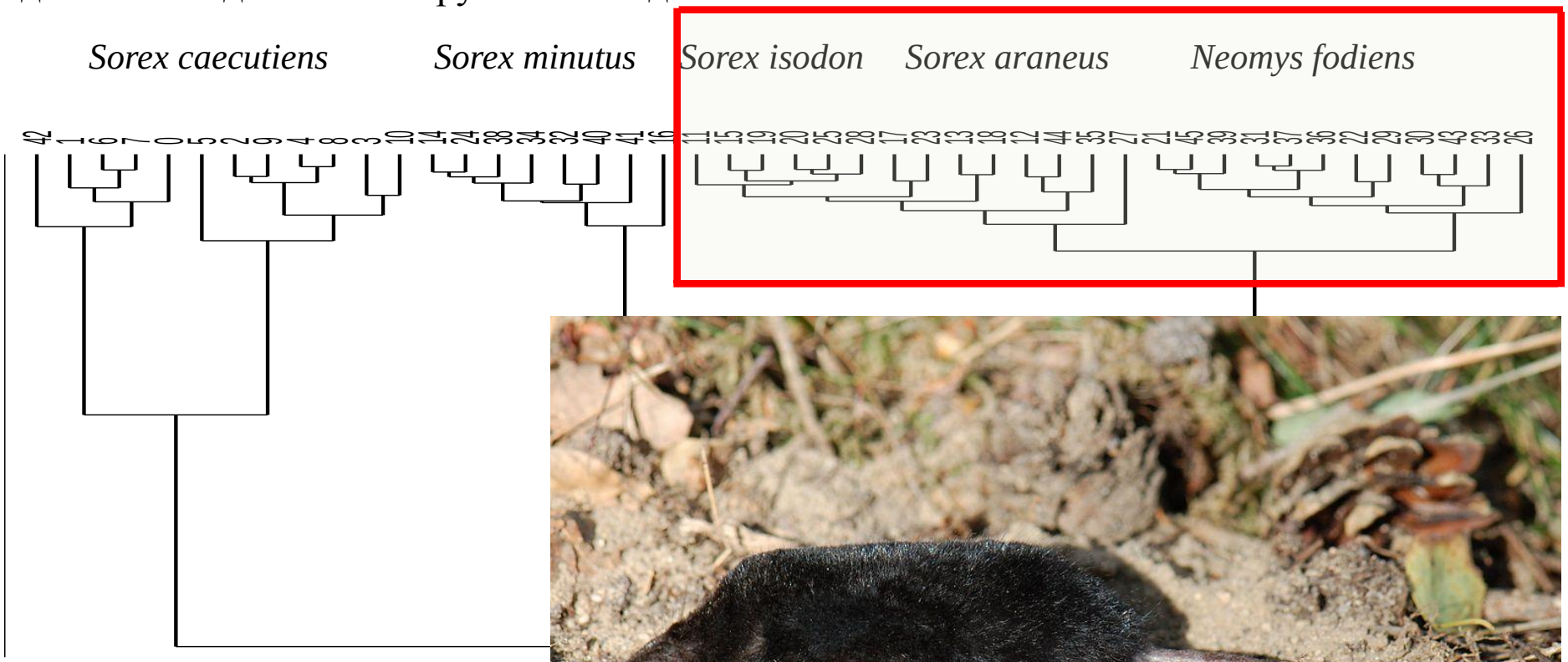


Дендрограмма, построенная на основе матрицы PrD

Примечание: многофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые различия между выборками по форме нижней челюсти ($F=12.41$; $p<0.0001$). Значения коэффициента кофенетической корреляции для матрицы дистанций по нижней челюсти ($r=0.88$) удовлетворительно.

Результаты

Дендрограмма, построенная на основе матрицы PrD, разделила массив данных без деления на группы по видам.

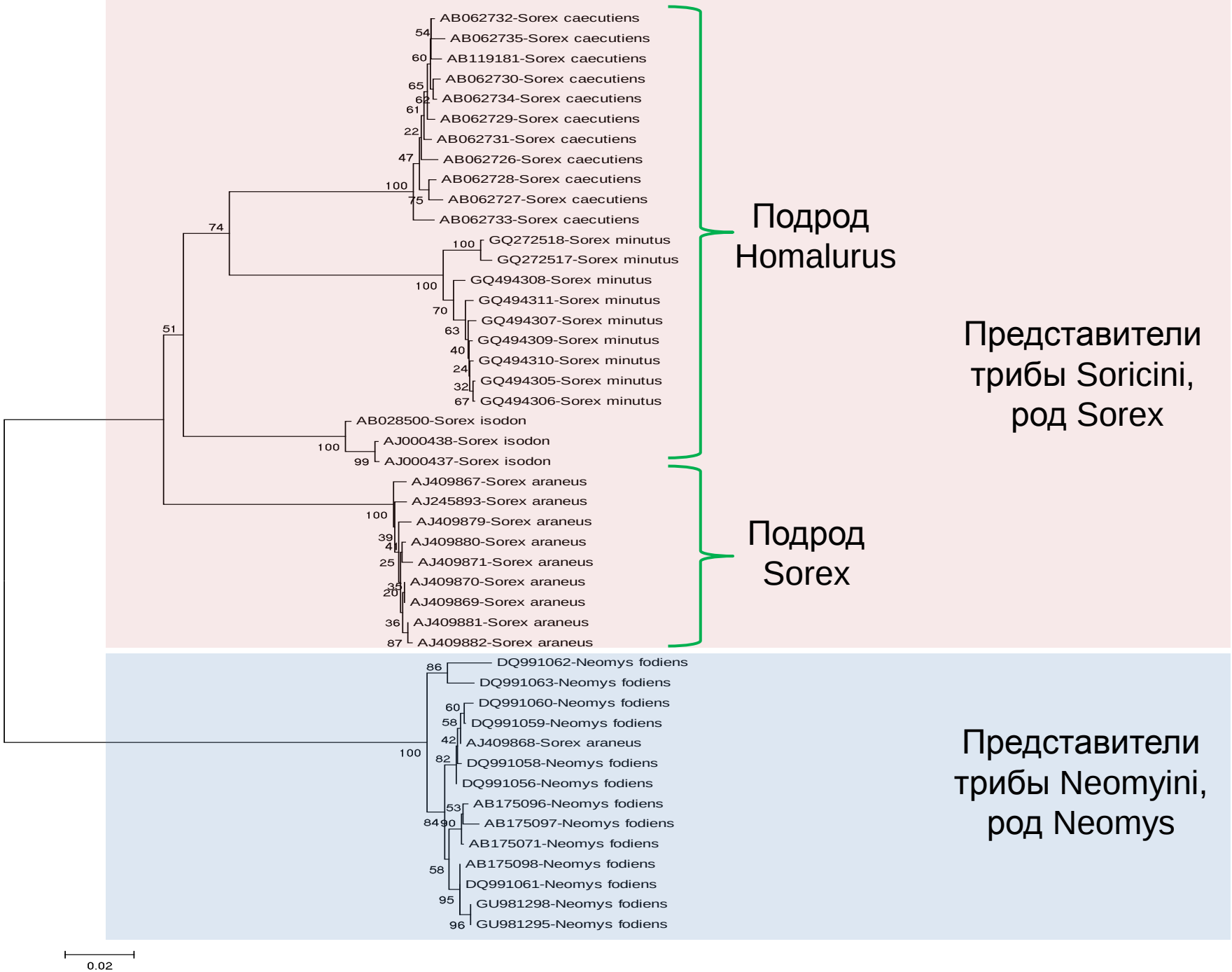


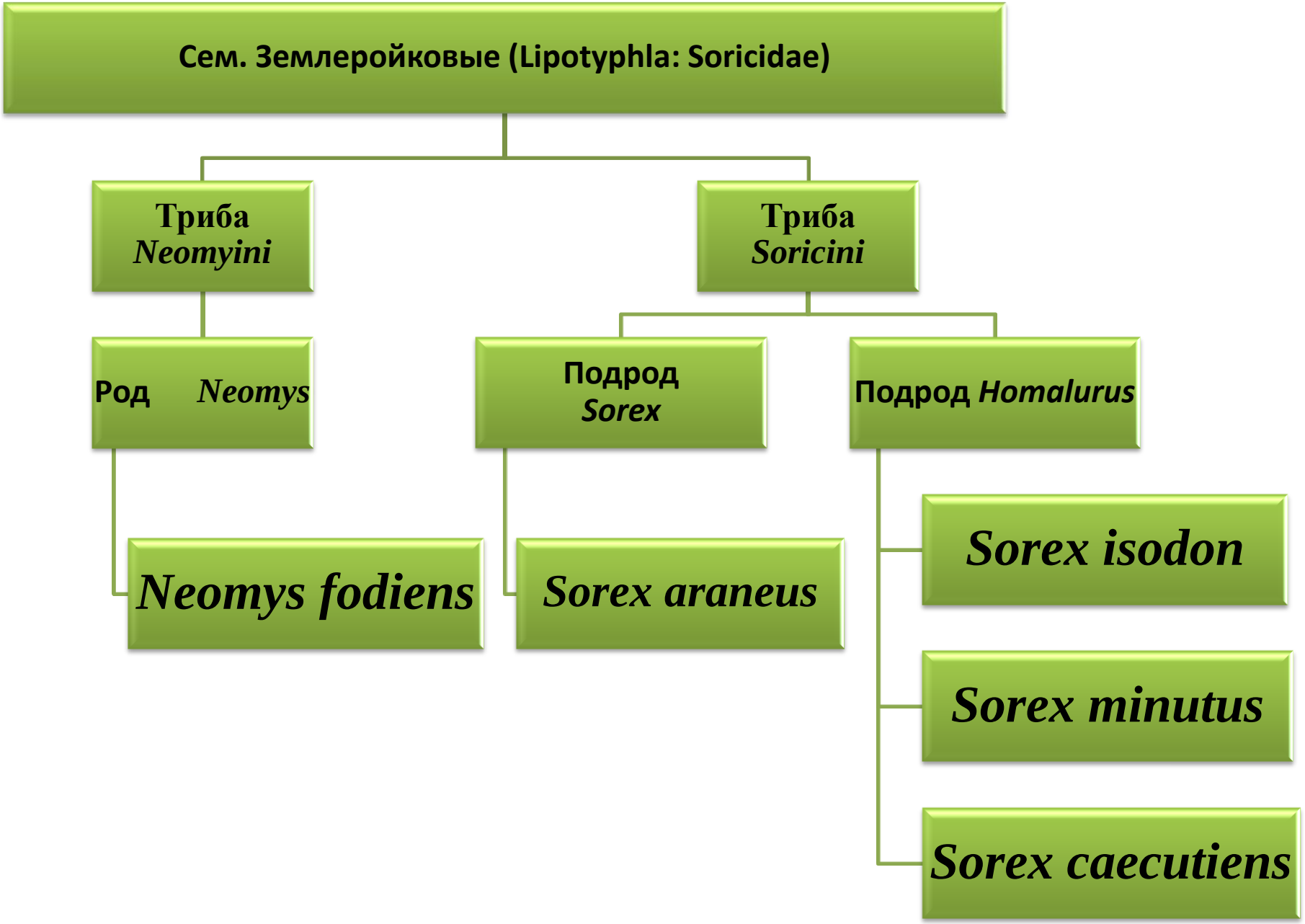
Дендрограмма, построенная

Примечание: многофакторный диспе
выборками по форме нижней челюсти
для матрицы дистанций по нижней че
(видов) Землеройковых по нижней ч
группами (p<0.001)

В связи с тем, что выборки пяти видов землероек могли быть неоднородны на видовом уровне, т.е. содержать животных, отловленных в разные годы, в нескольких смежных биотопах или локалитетах, мы протестировали каждую выборку на соответствие распределения значений CS модели нормального распределения (Normality tests).

- **Тест Шапиро-Уилка** выявил для всех пяти выборок, соответствующих разным видам, нормальное распределение (**Wmandible = 0.925–0.933, p > 0.05)**.
- **Тест Левине по форме (RW)**, проведенный для всех выборок, показал их однородность (**значимость теста p > 0.05**).
- **Многофакторный дисперсионный анализ** выявил статистически значимые различия между выборками по форме нижней челюсти (**F=12.41; p<0.0001**).
- **Дискриминантный анализ** пяти групп (видов) Землеройковых по нижней челюсти (PrC) выявил статистически значимые различия между всеми группами (**p<0.001**). Были определены дискриминационные признаки которые позволили разделить выборку, ими оказались **высота восходящей ветви и индекс наклона восходящей ветви**


AB062732-Sorex caecutiens
AB062735-Sorex caecutiens
AB119181-Sorex caecutiens
AB062730-Sorex caecutiens
AB062734-Sorex caecutiens
AB062729-Sorex caecutiens
AB062731-Sorex caecutiens
AB062726-Sorex caecutiens
AB062728-Sorex caecutiens
AB062727-Sorex caecutiens
AB062733-Sorex caecutiens
GQ272518-Sorex minutus
GQ272517-Sorex minutus
GQ494308-Sorex minutus
GQ494311-Sorex minutus
GQ494307-Sorex minutus
GQ494309-Sorex minutus
GQ494310-Sorex minutus
GQ494305-Sorex minutus
GQ494306-Sorex minutus
AB028500-Sorex isodon
AJ000438-Sorex isodon
AJ000437-Sorex isodon
AJ409867-Sorex araneus
AJ245893-Sorex araneus
AJ409879-Sorex araneus
AJ409880-Sorex araneus
AJ409871-Sorex araneus
AJ409870-Sorex araneus
AJ409869-Sorex araneus
AJ409881-Sorex araneus
AJ409882-Sorex araneus
DQ991062-Neomys fodiens
DQ991063-Neomys fodiens
DQ991060-Neomys fodiens
DQ991059-Neomys fodiens
AJ409868-Sorex araneus
DQ991058-Neomys fodiens
DQ991056-Neomys fodiens
AB175096-Neomys fodiens
AB175097-Neomys fodiens
AB175071-Neomys fodiens
AB175098-Neomys fodiens
DQ991061-Neomys fodiens
GU981298-Neomys fodiens
GU981295-Neomys fodiens
0.02
Подрод Homalurus
Подрод Sorex
Представители трибы Soricini, род Sorex
Представители трибы Neomyini, род Neomys


Сем. Землеройковые (Lipotyphla: Soricidae)
Триба Neomyini
Триба Soricini
Род Neomys
Подрод Sorex
Подрод Homalurus
Neomys fodiens
Sorex araneus
Sorex isodon
Sorex minutus
Sorex caecutiens

Анализ корреляции меду матрицами генетических и прокрустовых дистанций

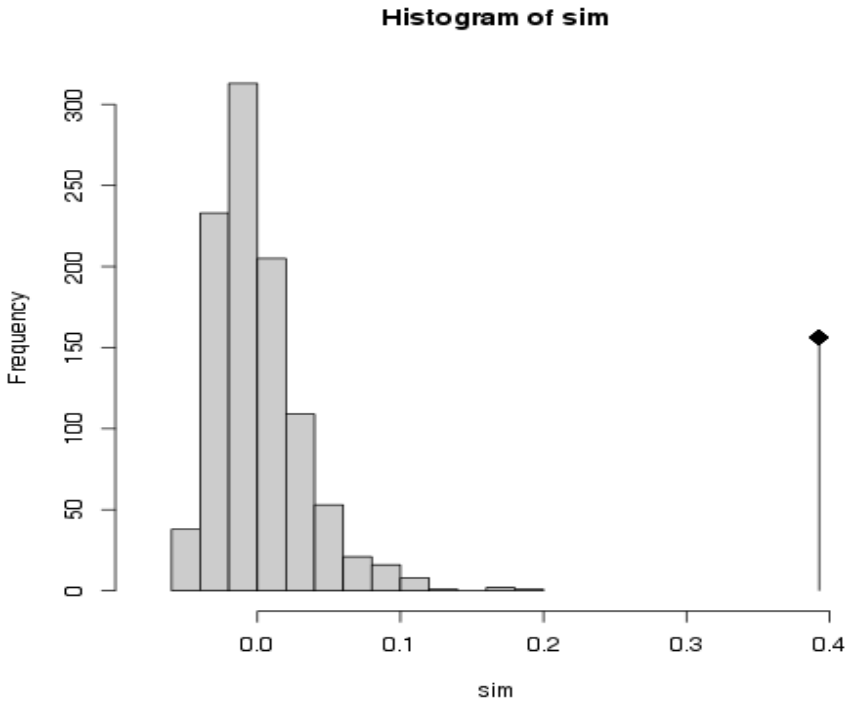
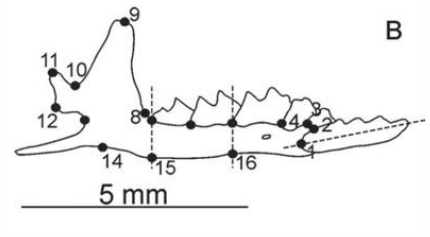
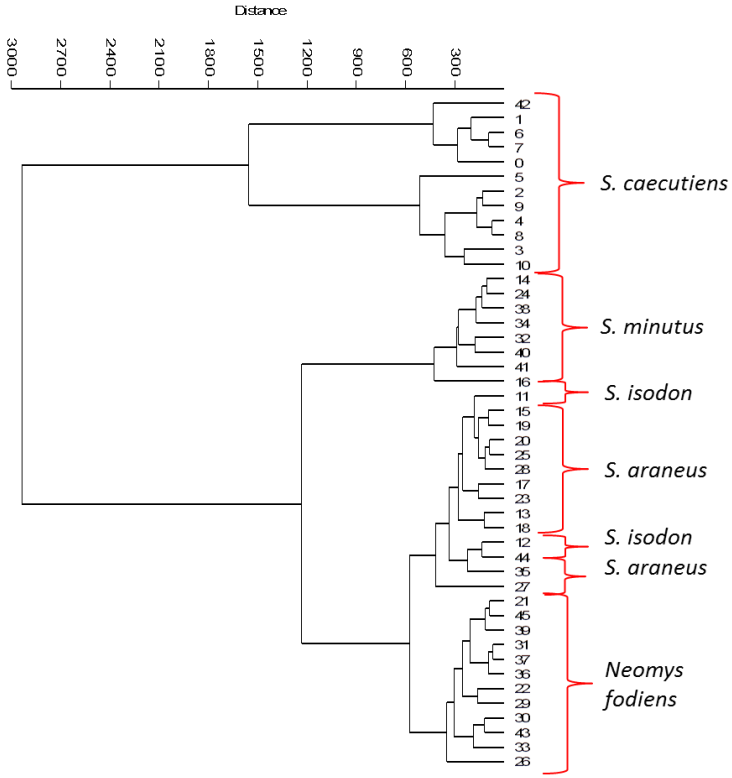


Рис. Результаты теста Мантела (999 повторов; коэффициент корреляции между матрицами - 0.39, p-value: 0.001).

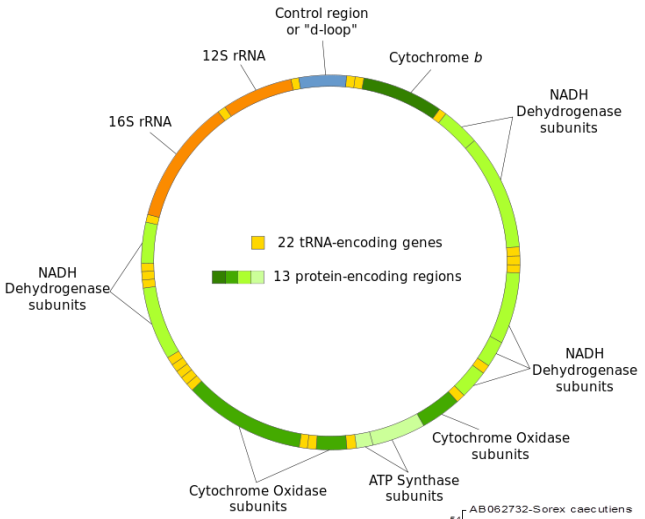
Оценка корреляции между матрицами генетических и прокрустовых дистанций, основанных на межвидовом различии с высокой статистической значимостью, показала, что связь между матрицами есть, но достоверно низкая (p-value: 0.001, коэффициент корреляции – 0.39). Другими словами, дифференциация рассматриваемых групп по генетическим маркерам (мтДНК) не полностью соответствует дифференциации, основанной на морфометрии нижней челюсти (геометрическая краниометрия нижней челюсти).

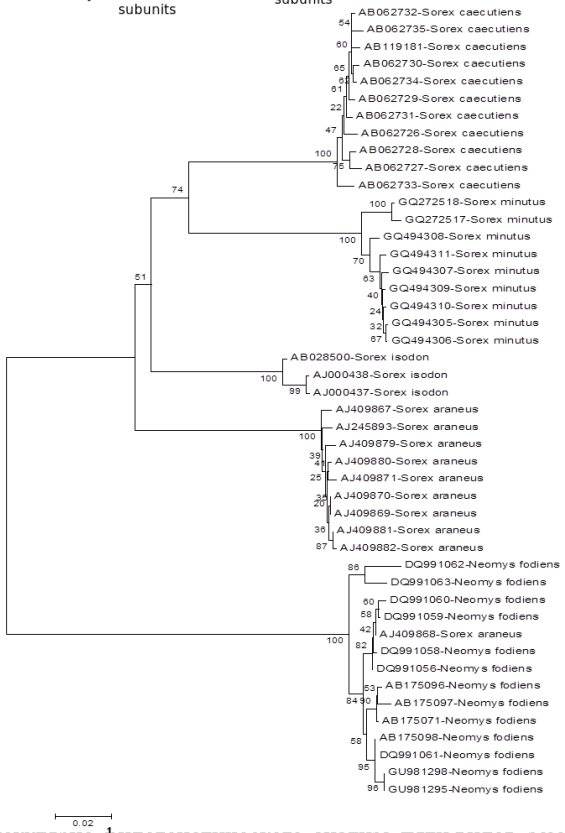


Метки на латеральной стороне нижней челюсти



Результаты кластерного анализа (метод UPGMA) по нижней челюсти землероек на основе матрицы прокрустовых дистанций





Результаты молекулярно-филогенетического анализа пяти видов землероек на основании сравнения гена *cyt b* мт ДНК (метод ближайшего связывания (NJ)).

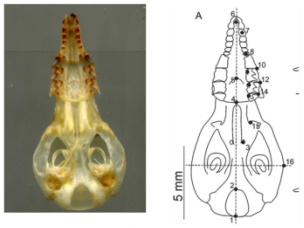
Заключение

Оценка эволюционных преобразований на морфологическом и генетическом уровнях пяти видов семейства Землеройковые позволило отметить, что топология дендрограммы, построенной по данным геометрической морфометрии, отражает экологию видов и не показывает систематического положения видов.

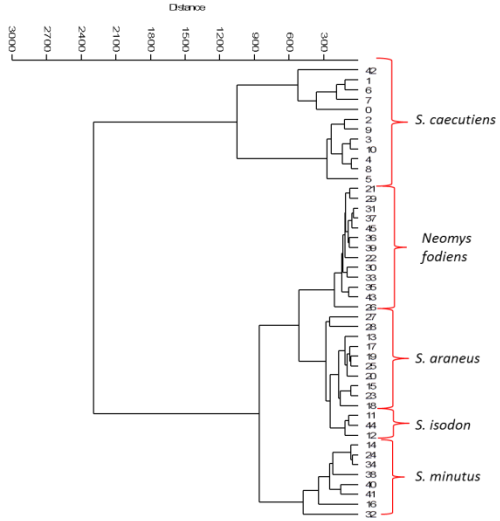
Взаимосвязь с общепринятой таксономической классификацией мы можем проследить только по данными молекулярно-генетического анализа последовательностей *cytb* мтДНК.

Таким образом, исследование данной группы животных показало высокую роль адаптации в формировании краниометрических отличий. Полагаем, что в рассматриваемых группах маркеры, основанные на изменчивости мтДНК, могут использоваться как в совокупности с маркерами морфометрической изменчивости, а также как независимый показатель популяционных взаимосвязей.

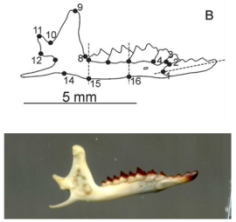
Спасибо за внимание!



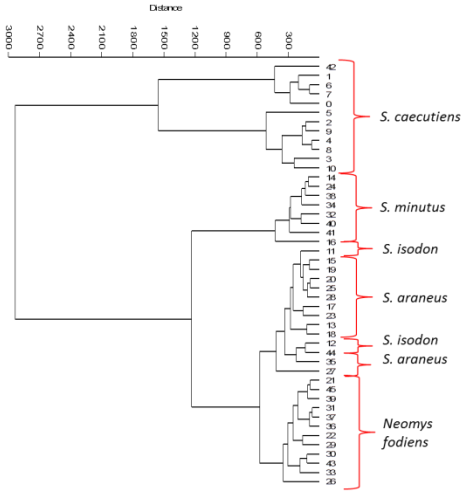
Метки на вентральной стороне черепа



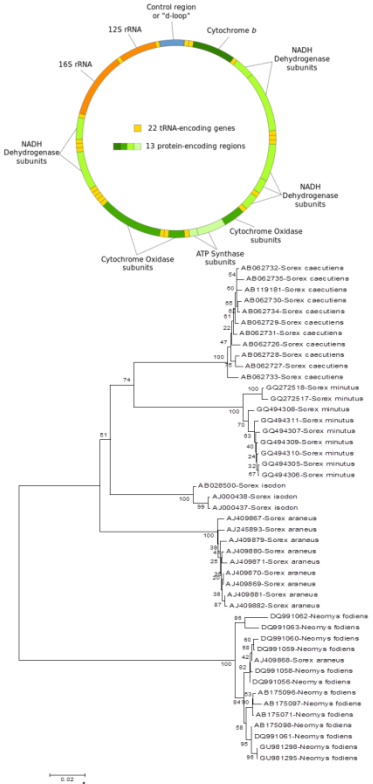
Результаты кластерного анализа (метод UPGMA) по форме черепа землероек на основе матрицы прокрустовых дистанций



Метки на латеральной стороне нижней челюсти



Результаты кластерного анализа (метод UPGMA) по нижней челюсти землероек на основе матрицы прокрустовых дистанций



Результаты молекулярно-филогенетического анализа пяти видов землероек на основании сравнения гена *cyt b* мт ДНК (метод ближайшего связывания (NJ)).