

УДК 575.17:597.9:591.53

**ФИЛОГЕОГРАФИЯ СИБИРСКОГО УГЛОЗУБА (*Salamandrella keyserlingii*)
ПО ДАННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК**© 2008 г. Н. А. Поярков^{1,2}, С. Л. Кузьмин²¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра зоологии позвоночных, Москва 119991; e-mail: ipe51@yahoo.com²Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва 119071; e-mail: poyarkov@orc.ru

Поступила в редакцию 12.02.2007 г.

Окончательный вариант получен 19.09.2007 г.

Проанализирована дифференциация географических популяций сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*) в пределах всего видового ареала по данным последовательностей фрагмента гена цитохрома b. Наиболее обособлена приморская популяция, за ней следуют популяции из Японии и Южных Курил. Географическая дифференциация популяций в сибирской части ареала ниже; она не проявляет клинальной изменчивости и неравномерна. Молекулярная изменчивость *S. keyserlingii* подтверждает гипотезу наличия нескольких первичных викарирующих рефугиев доплейстоценовой дифференциации общего предка *Salamandrella* в юго-восточной части его современного ареала и поэтапного процесса колонизации северных и западных территорий, связанного с повторяющимися этапами расселения и отступления на сибирской части современного ареала вида.

Сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii*) – представитель примитивного семейства углозубых (Hynobiidae). Он обладает наиболее обширным ареалом среди земноводных Палеарктики, населяя северо-восток европейской части России, Сибирь, север Казахстана, Монголии, Китая, Кореи и Японии. Вместе с тем для этого вида характерна крайняя морфологическая однородность без четких тенденций географической изменчивости, в связи с чем таксоны, описанные ранее на его основе, были сочтены невалидными [1, 2]. Отмечались различия в экологии отдельных популяций в разных частях ареала, морфологические и онтогенетические модификации [1, 3–6], а также генетическая изменчивость [7, 8]. Некоторые авторы отмечали особый статус популяций из Приморского края [4, 5, 8, 9]. Недавно были опубликованы работы Д.И. Бермана с соавт. [10, 11], в которых приморским популяциям придается видовой статус. Авторы анализировали фрагмент гена цитохрома b митохондриальной ДНК и пришли к заключению, что наблюдаемая молекулярная дифференциация между популяциями из Приморья и Сибири достаточна для разделения сибирского углозуба на два вида. Для углозубов, ранее [8, 9] обозначавшихся как *S. keyserlingii tri-dactyla*, они ввели название *schrenckii* (Приморье и юг Хабаровского края), а для остальных популяций (почти весь ареал, в основном Сибирь) – *keyserlingii*.

Огромная область распространения и неоднородный характер географической изменчивости молекулярных маркеров делают сибирского углозуба привлекательным объектом для изучения его филогеографии. Более того, это один из не-

многих видов земноводных, процветающих в суровых условиях Заполярья. Однако молекулярное исследование изменчивости вида в пределах всего ареала пока не проводилось, хотя именно такие данные необходимы для выяснения путей дифференциации географических популяций и попытке реконструкции истории формирования ареала вида. Настоящая статья посвящена этому вопросу. В ней мы не будем анализировать таксономию и рассматривать проблему видового статуса приморских углозубов. Поэтому ниже мы обозначаем два указанных выше таксона соответственно как “приморская форма” и “сибирская форма”.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал. Изучены образцы тканей углозубов, представляющих как материковые, так и островные популяции Сахалина, Парамушира, Кунашира и Хоккайдо. Всего проанализировано 173 экз. из 30 материковых и 4 островных популяций (таблица; рис. 1). Средний размер выборки составил 5 экз. на популяцию, что, как правило, считается достаточным для филогеографических исследований [12, 13]. Максимальный объем выборки – 10 экз. (заповедник “Кедровая Падь”), минимальный – 1 экз. (о. Парамушир, что связано с плохим качеством материала). Помимо оригинальных материалов в анализ включены последовательности фрагмента гена цитохрома b 86 экз. сибирского углозуба, опубликованные в работах Д.И. Бермана и соавт. [10, 11] (коды последовательностей в GenBank NCBI data-base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) (AY701904–AY701989).

Точки сбора материала

№	Точки сбора материала	Область	Координаты		N
			с.ш.	в.д.	
1	г. Лекма, Слободской р-н	Кировская	59°02'	49°56'	8
2	окр. г. Екатеринбург	Свердловская	56°51'	60°36'	8
3	г. Екатеринбург	»	56°51'	60°36'	8
4	г. Томск	Томская	56°29'	84°57'	4
5	окр. г. Томск	»	56°29'	84°57'	9
6	п. Марусино, Толмачевский р-н	Новосибирская	55°02'	82°45'	4
7	р. Таз, окр. п. Киккиаки	Ямало-Ненецкий АО	63°48'	82°46'	8
8	окр. г. Новосибирск	Новосибирская	55°02'	82°56'	6
9	окр. г. Красноярск	Красноярский край	56°00'	92°49'	3
10	п. Култук, Слюдянский р-н	Иркутская	51°43'	103°39'	4
11	пристань Камниокан	Бурятия	56°34'	113°34'	4
12	п. Хасурта	»	52°17'	108°52'	4
13	р. Онон, Хапчерангский р-н	Читинская	49°38'	112°32'	2
14	окр. г. Якутск	Саха Якутия	62°02'	129°44'	8
15	долина р. Майн (1), Марковский р-н	Чукотская	64°53'	171°46'	1
16	р. Майн (2, 3), Марковский р-н	»	64°28'	171°45'	4
17	оз. Южно-Курильское, Озерновский р-н	Камчатская	51°24'	157°5'	8
18	о. Парамушир	»	50°38'	156°07'	2
19	окр. г. Магадан	Магаданская	59°35'	150°48'	9
20	г. Облучье	Еврейская АО	49°01'	131°03'	3
21	с. Преображеновка	»	48°04'	131°54'	3
22	окр. г. Хайлар	Внутренняя Монголия	48°50'	120°31'	4
23	Норский заповедник, Селемджинский р-н	Амурская	52°38'	130°19'	8
24	23 км южнее Красной Речки, Хабаровский р-н	Хабаровский край	48°12'	135°6'	4
25	окр. г. Холмск	Сахалинская	47°03'	142°04'	4
26	р. Серебрянка, о. Кунашир	»	44°03'	145°49'	2
27	болото Кусиро, окр. г. Кусиро	Хоккайдо, Япония	43°01'	144°22'	2
28	заповедник "Кедровая Падь"	Приморский край	43°04'	131°33'	10
29	Шкотовское плато	»	43°21'	132°24'	8
30	г. Артем	»	43°22'	132°10'	2
31	с. Кондратеновка	»	43°37'	132°10'	2
32	г. Владивосток	»	43°07'	131°55'	5
33	п. Павло-Федоровск, р. Сунгача, Кировский р-н	»	45°08'	133°16'	8
34	Байшань, район пос. Хуадянь	Пров. Гири, КНР			4

Примечание. Номера точек соответствуют номерам на рис. 1. N – объемы выборок.

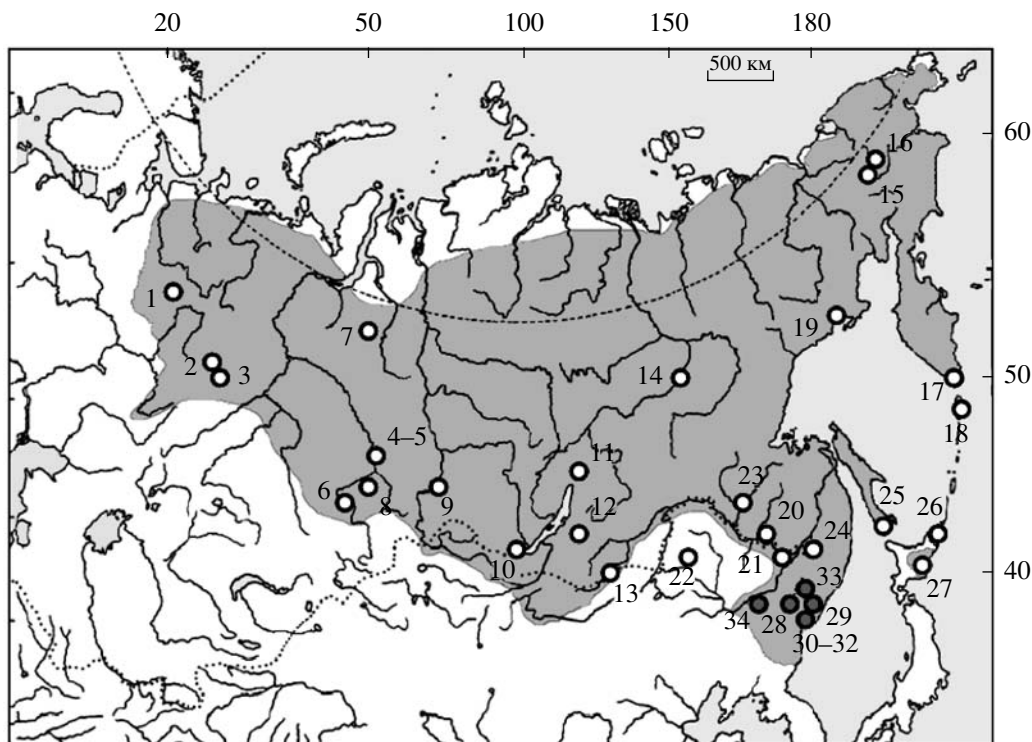


Рис. 1. Распространение сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*) и положение изученных популяций в ареале. Номера популяций соответствуют номерам точек, указанным в таблице. Белыми кружками показаны исследованные популяции сибирской, а серыми – приморской форм.

Последовательность цитохрома *b* представителя близкого рода *Hynobius* (семейство Hynobiidae) – маньчжурского углозуба (*Hynobius leechii*) была получена по стандартной методике из экземпляра из Кореи, последовательность другого экземпляра того же вида была взята из GenBank NCBI data-base (NC 008079).

Выделение ДНК. Для выделения ДНК брали образцы мышечной ткани (хвосты, конечности, язык) или печени. Тотальную геномную ДНК выделяли из замороженной, свежей или фиксированной в 96%-ном этаноле ткани с использованием SDS-протеиназы К/фенол-хлороформной методики [13, 14]. Для ряда образцов выделение ДНК также осуществлялось с помощью наборов Diatom DNA-Prep (“IsoGen”, Россия). Объем выделенной ДНК на образец составлял 100 мкл. Тотальную ДНК подвергали электрофорезу в агарозном геле с бромистым этидием и визуализировали в УФ-свете в присутствии отрицательного и положительного контроля. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре по стандартной методике.

ПЦР и секвенирование. Для амплификации фрагмента гена цитохрома *b* использованы модифицированные праймеры – прямой MVZ15 (5'-GAA СТА АТG GCC САС АСА/Т А/ТТА СGT/А ААА/Т-3') и обратный MVZ16 (5'-AAA TAG GAA

А/GT/AA ТТА Т/СТС/Т TGG TTT А/GA/GT-3'), основанные на праймерах, разработанных для безлегочных саламандр сем. Plethodontidae [15] и успешно примененных ранее к углозубам рода *Batrachuperus* [16]. Амплификацию проводили с использованием Gene Pack (“IsoGen”, Россия) Taq-ДНК-полимеразы. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) шла в общем объеме смеси 20 мкл при следующих условиях: после денатурации (92°C, 3 мин) следовали 35 циклов (денатурация – 92°C, 30 с; отжиг праймеров – 45–49°C, 45 с; элонгация – 72°C, 60 с). Фрагменты гена цитохрома *b* визуализировались на электрофорезе в УФ-свете в присутствии отрицательного и положительного контроля. Концентрацию ампликонов определяли на спектрофотометре по стандартной методике. Продукты ПЦР-реакции очищали с использованием набора PCR-purification kit (Millipore, Bedford, USA). Секвенирование фрагмента цитохрома *b* проводили на автоматическом секвенаторе ABI 377 (USA) с использованием набора Big-Dye Ready-Reaction kit (USA). Для реакции ПЦР при секвенировании всегда использовали прямой (MVZ15) праймер, в тех случаях, когда была получена короткая последовательность ампликона, реакцию ставили второй раз с обратным праймером (MVZ16).

Анализ последовательностей ДНК. Полученные последовательности фрагмента гена цитохрома *b* просматривали в программе Chromas v. 1.45, после чего выравнивали вручную в программе BioEdit v. 5.0.9. Построение дендрограмм по алгоритму ближайшего соседа на основе генетических дистанций по Кимура [35] проводили в программах TreeCon v. 1.3b и TreeView v. 1.6.6 [17]. При этом последовательности цитохрома *b* других углозубых (маньчжурского углозуба *Hynobius leechii*, восточно-китайского углозуба *Hynobius chinensis* и семиреченского лягушкозуба *Ranodon sibiricus*) служили внешними группами. Надежность ветвей оценивали бутстрэп-анализом (1000 реплик). Для филогенетического анализа – построения кладограмм по методу максимального правдоподобия (maximum parsimony) [18], калькуляции попарных генетических различий (*p*-дистанций) и оценки генетического разнообразия исследованной выборки применялся пакет программ Mega 3 [19]. Для построения медианных сетей гаплотипов (median haplotype network) и распределения попарных расстояний (pairwise mismatch distribution) использовали программы Arlequin ver. 2.000 (2000) и Network 4.1.1.2 (2004). Анализ распределения попарных расстояний был успешно применен ранее [20, 21]. Предполагается, что он может иллюстрировать колебания численности популяции в прошлом [22], причем унимодальный характер распределения попарных расстояний соответствует всплеску численности популяции, а полимодальный интерпретируется как свидетельство длительной демографической стабильности популяций [12]. Хотя из-за неравномерностей выборок могут наблюдаться погрешности, сопоставление характеров распределения попарных расстояний между отдельными филетическими линиями, представленными даже неодинаковыми по размеру выборками, возможно. Этот анализ полезен в случаях исследования отдельных генеалогических линий или популяций и был успешно применен ранее для выявления особенностей демографической истории популяций хвостатых земноводных [23].

Полученные последовательности 63 гаплотипов фрагмента гена цитохрома *b* для 173 исследованных особей *S. keyserlingii* помещены в базу данных GenBank NCBI data-base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) (коды последовательностей: EU156965–EU157028).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выравненный фрагмент цитохрома *b* составил 780 тпн. Всего для 173 образцов из 34 выборок сибирского углозуба было обнаружено 63 гаплотипа фрагмента цитохрома *b*, из них 44 принадлежали популяциям из Сибири и островной части ареала (27 выборок), а 19 гаплотипов были специфичны для популяций с Дальнего Востока России и прилегающей территории КНР (7 выборок). В последовательности фрагмента цитохрома *b* не было найдено стоп-кодона, делеций или инсерций.

Общая средняя генетическая дистанция (overall mean distance) для выборки составила $d = 0.0645$ (Kimura 2-parameter). Выявленная дивергенция изученного фрагмента гена для популяций приморской формы была значительно выше, чем для сибирской, и составила $d = 0.0249$ против 0.0138 (Kimura 2-parameter). Максимальные значения внутривидовой дивергенции гаплотипов выявлены для популяций приморской формы и составили $d = 0.058$, что согласуется с данными о крайне высоком внутривидовом полиморфизме гаплотипов цитохрома *b* для приморской формы [10, 11].

Средняя генетическая дистанция между приморской и сибирской формами оказалась значительной и составила $d = 0.1338$, среднее внутривидовое разнообразие $d = 0.0193$ (Kimura 2-parameter).

Полученная кладограмма (рис. 2) устойчива, основные ее ветви имеют высокие индексы бутстрэп-поддержки ($BS > 75\%$). Исследованные гаплотипы *Salamandrella* образуют монофилетическую группу с двумя значительно обособленными достоверно монофилетическими (100% BS) кладами, соответствующими приморской и сибирской формам. Клада, объединяющая приморские популяции, лучше разрешена и представлена тремя кластерами гаплотипов с высокими индексами бутстрэп-поддержки.

В кладе сибирской формы углозуба большая часть гаплотипов из сибирской части ареала сгруппированы в плохоразрешенную кладу. В сибирской кладе наиболее базальное положение занимает “длинная” ветвь, объединяющая образцы с островов Хоккайдо и Кунашир (100% BS). Далее в сибирской кладе базальное положение занимают выборки из южных и восточных популяций (о. Сахалин, Внутренняя Монголия и Читинская область). Остальные гаплотипы сибирской формы углозуба крайне мономорфны и формируют плохоразрешенную ветвь. Некоторые географически близкие популяции группируются в клады с низким уровнем бутстрэп-поддержки (например, образцы с о. Парамушир и Камчатки или популяции из Приамурья – Еврейская АО, Хабаровский край и Амурская обл.).

Географическая дифференциация популяций сибирской формы не проявляет клинальной изменчивости и неравномерна: дистанция между наиболее географически удаленными краевыми популяциями поразительно мала. Так, в одну группу попадают выборки из Кировской области, Ханты-Мансийского АО, Республики Саха (Якутия), Чукотки и Камчатки. Внутривидовая изменчивость гаплотипов в популяциях углозуба с северной границы ареала заметно ниже: $d = 0.0049$ (Kimura 2-parameter).

Данные распределения попарных различий между последовательностями фрагмента гена цитохрома *b* для группы сибирских и приморских уг-

лозубов демонстрируют явственные различия. Так, для сибирской формы заметно (рис. 3), что конфигурация распределения явно унимодальна и далека от колоколообразной, максимальная частота характерна для сравнений с небольшими различиями между гаплотипами. Невзвешенное среднее значение попарных различий между последовательностями составляет 11.188. Для приморской формы распределение попарных различий не унимодально, а имеет несколько явственных пиков в области 1, 11, 16, 26, 31–36, 61 (значения попарных различий), соответствующих разным модальным значениям попарных различий (рис. 4). Невзвешенная средняя попарных различий между последовательностями составляет 20.472, т.е. опять же заметно сдвинута в сторону больших различий между сравниваемыми гаплотипами, чем в сибирской группе.

Анализ медианных сетей гаплотипов (median-joining network) иллюстрирует пути формирования одних гаплотипов от других. На рис. 5 показана схема медианных сетей выявленных гаплотипов сибирского углозуба. Хорошо заметно, что гаплотипы сибирской и приморской форм образуют два обособленных центра с принципиально разным характером “ветвления”.

В случае с приморской формой мы видим несколько значительно обособленных гаплотипов, связанных друг с другом последовательно и не образующих четко выделенного центра. При этом частоты встреч большинства выявленных гаплотипов сопоставимы. В случае с сибирской формой наблюдается несколько гаплотипов с крайне высокой частотой встреч, образующих центр медианной сети, от которого отходят все остальные гаплотипы. Заметно обособлены лишь популяции с Хоккайдо и Кунашира. При этом частоты встреч большинства гаплотипов значительно ниже, чем у нескольких центральных.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наши данные подтверждают ранее сделанные выводы об обособленности приморской географической популяции углозуба [9–11]. Но необходимо отметить, что восстановление названия *schrenckii* [10] для этой популяции создало таксономическую коллизию, так как в оригинальном описании *Isodactylum schrenckii* Strauch, 1870 указано, что этот вид еще раньше был описан под названием *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870. Отсюда возникает вопрос о том, что название *I. schrenckii* опубликовано в качестве младшего синонима *S. keyserlingii* – в этом случае, согласно

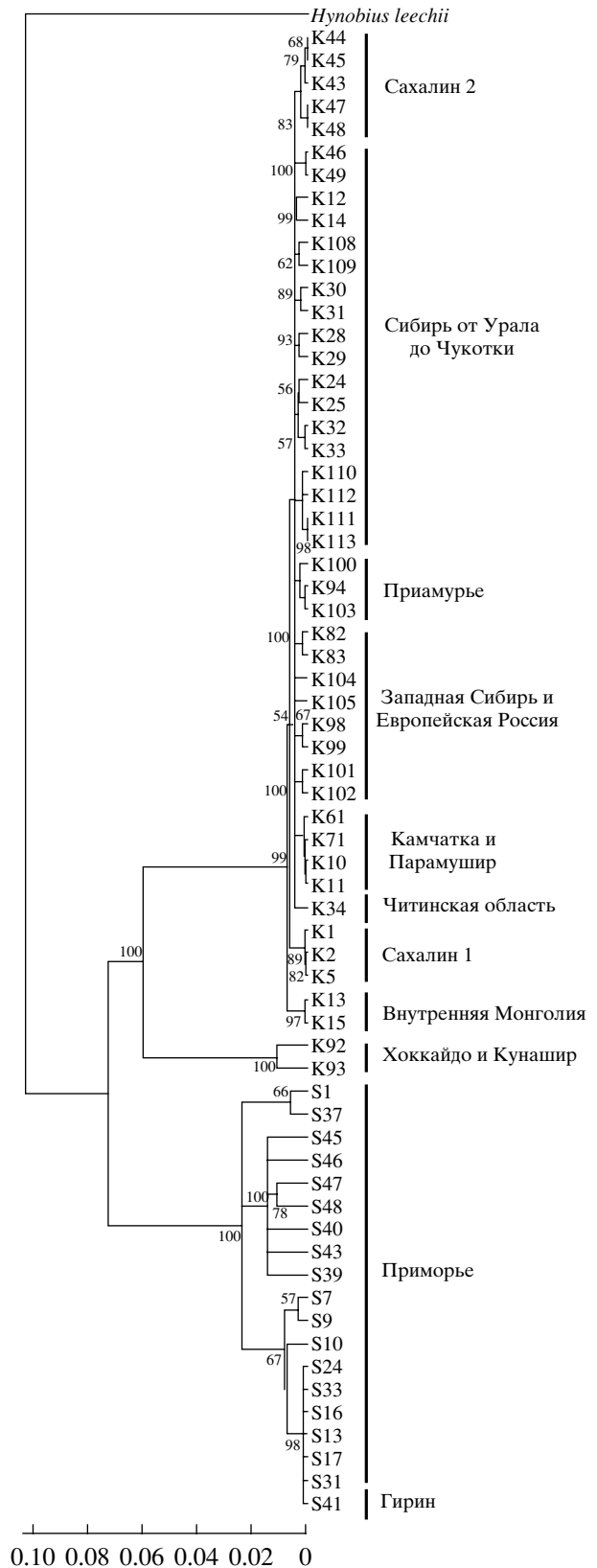


Рис. 2. Кладограмма филогенетических взаимоотношений выявленных 63 гаплотипов цитохрома b для исследованных выборок *Salamandrella*. Кладограмма построена по алгоритму ближайшего соседа (neighbour joining), генетическая дистанция – по Кимура [35], показаны значения бутстрепа, превышающие 50%.

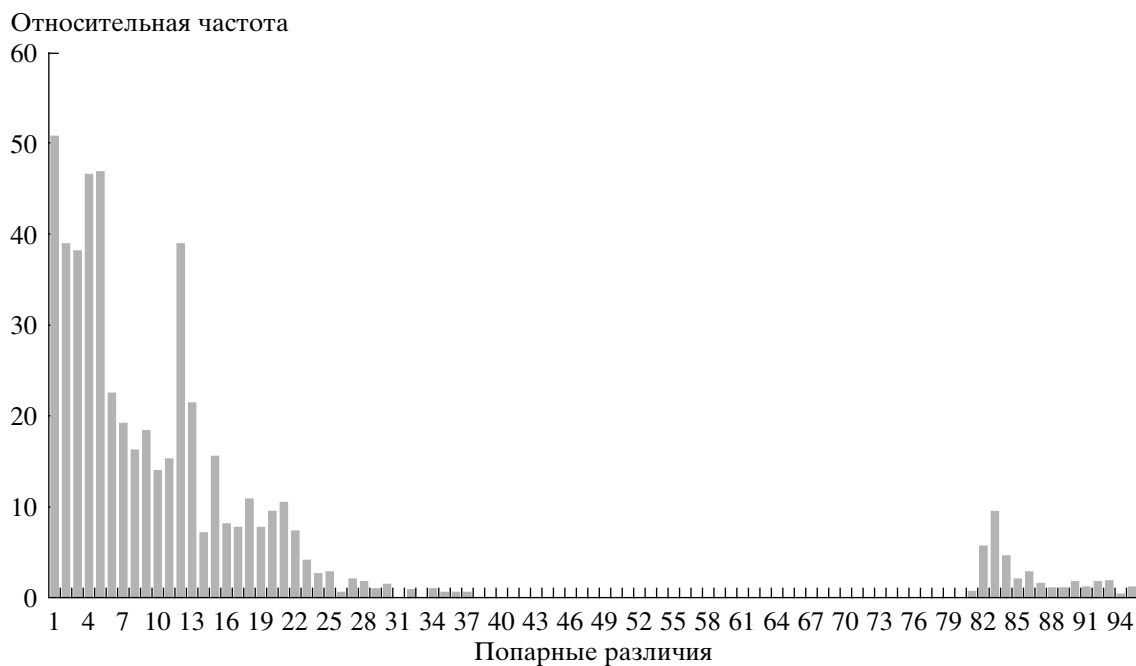


Рис. 3. Распределение попарных различий между последовательностями фрагмента гена цитохрома b для сибирской формы углозуба. Заметно, что форма распределения далека от колоколообразной. Невзвешенное среднее значение попарных различий между последовательностями составляет 11.188.

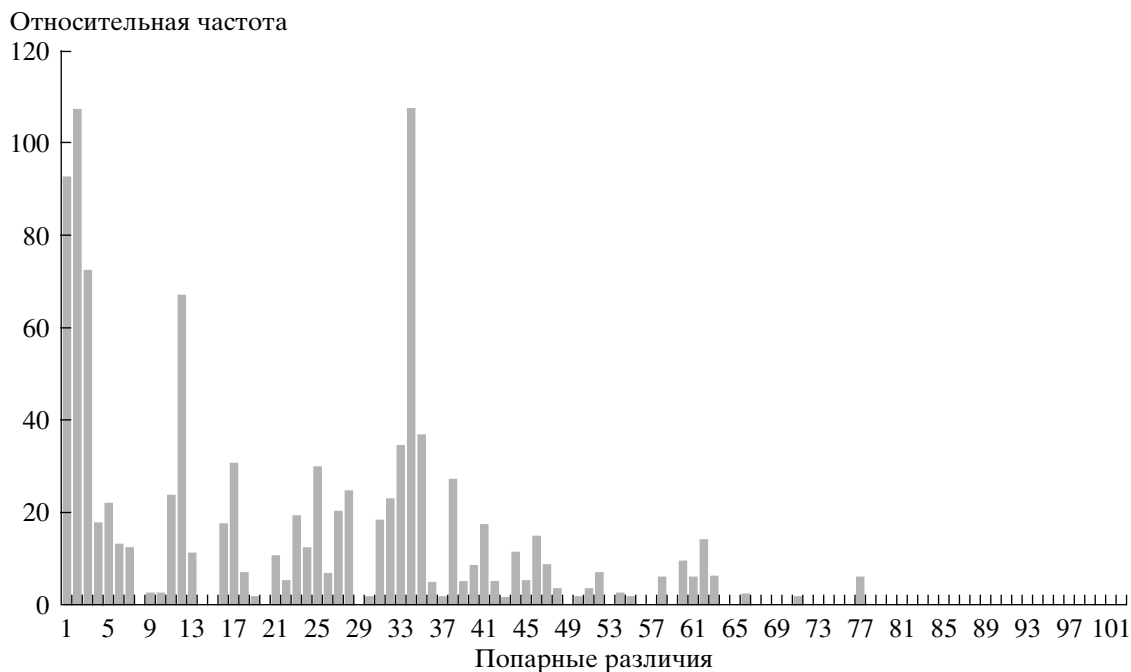


Рис. 4. Распределение попарных различий между последовательностями фрагмента гена цитохрома b для приморской формы углозуба. Распределение имеет явственный пик в области 31–36, соответствующий модальным значениям попарных различий. Невзвешенное среднее значение попарных различий между последовательностями составляет 20.472.

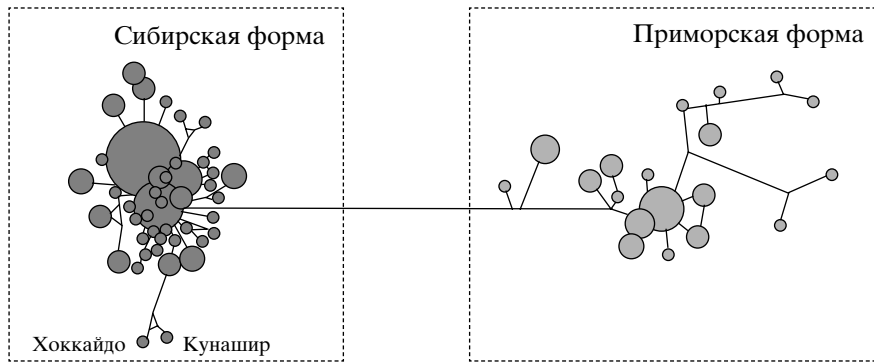


Рис. 5. Схема медианных сетей (median-joining network) выявленных гаплотипов углозуба. Гаплотипы обозначены кругами, диаметр кругов соответствует числу особей с выявленными гаплотипами. Обнаруженные гаплотипы цитохрома b иллюстрируют две филетические линии сибирского углозуба – приморскую и сибирскую. Первая представлена различными значительно разошедшимися гаплотипами, вторая – несколькими центральными гаплотипами с максимальной численностью и рядом периферических редких гаплотипов. Популяции с Хоккайдо и Курильских островов заметно обособлены.

“Международному кодексу зоологической номенклатуры” (2004), использование названия *schrenckii* для приморской популяции является неправомерным актом.

Недавно было опубликовано исследование филогенетических взаимоотношений представителей семейства Hynobiidae по данным полных митогеномических последовательностей ряда представителей большинства известных родов семейства [24]. Однако публикации, обобщающие данные по молекулярной дифференциации Hynobiidae на видовом и внутривидовом уровнях, на сегодняшний день отсутствуют. Наши предварительные данные свидетельствуют о крайне высокой внутривидовой дифференциации ряда форм семейства Hynobiidae (межпопуляционные и внутрипопуляционные генетические дистанции d превышают 0.05). Д.И. Берманом с соавт. [10] также были выявлены крайне высокие значения генетической дистанции между гаплотипами, выявленными в одной популяции приморской формы сибирского углозуба, соответствующие и даже превышающие межвидовые различия, показанные для хвостатых земноводных семейства Salamandridae. Это согласуется с гипотезой о различной скорости генетической дифференциации в пределах разных филетических групп семейства Hynobiidae. Пока не удалось выдвинуть универсальный для данного семейства уровень различий, соответствующий видовому уровню дифференциации. Для этого семейства нет и достоверных калибровок молекулярных часов. Широко применяемые оценки скорости молекулярной эволюции у саламандр [11, 25], основанные на дивергенции трех видов *Euproctus* (Salamandridae), нельзя использовать для Hynobiidae, так как они разрабо-

таны на представителях другой ветви Caudata. Недавно получены данные, свидетельствующие о полифилии рода *Euproctus* [26], что затрудняет интерпретацию молекулярной дифференциации различных групп хвостатых, основываясь на оценках, предложенных ранее [25].

Несомненно, молекулярная дифференциация приморской и сибирской формы *Salamandrella keyserlingii* крайне значительна и превышает таковую для многих видов рода *Hynobius*. Ни коллегами, ни нами не было выявлено никаких промежуточных гаплотипов, что свидетельствует о давней дифференциации. Согласно современным представлениям о молекулярной филогении и систематике хвостатых амфибий, основывающихся на распространенной филогенетической концепции вида [27], эти данные подтверждают видовой статус приморской формы сибирского углозуба.

Однако, с нашей точки зрения, для подтверждения этого статуса необходимо применение биологической концепции вида. Так, например, значительная молекулярная дифференциация северной и южной форм мраморного тритона, *Triturus marmoratus*, Salamandridae, позволила предложить для них видовой статус [28]. Однако эта работа проводилась в Испании, где две формы оказались географически изолированными друг от друга. После этого в Португалии было проведено исследование зоны контакта между двумя формами, где была показана ограниченность потока генов в пределах симпатрических популяций обеих форм, что рассматривалось как доказательство их видовой статус [29].

В настоящее время нам неизвестны барьеры между приморским и сибирским углозубами. Возможно, обе формы распространены парапатри-

чески, поэтому необходимо проверить наличие потока генов между их краевыми популяциями.

Показанное наличие приморских гаплотипов в популяциях из Хабаровского края [10, 11] вблизи от популяций, имеющих сибирский гаплотип (наши данные), крайне интересно. Возможно, оно свидетельствует о наличии зоны контакта между двумя формами углозуба в среднем–нижнем течении Уссури. Нельзя исключить и возможную гибридизацию между ними, приведшую к частичной интрогрессии митохондриальных гаплотипов. Уже после подачи данной рукописи в печать Д.И. Берман сообщил нам о выявлении популяции сибирского углозуба, где были встречены кладки, морфологически напоминающие типичные кладки обеих форм. Это позволяет предположить возможность симпатрии сибирской и приморской форм и наличия зоны контакта между ними.

Таким образом, вопрос о видовом статусе приморских углозубов остается открытым. Его детальное обсуждение не входит в задачи этой статьи. Наше мнение о видовом статусе сибирского углозуба из Приморья в большой степени зависит от дальнейшего изучения зоны контакта между двумя формами и оценкой интенсивности потока генов между филетическими линиями.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что дифференциация между двумя кладами сибирского углозуба весьма значительна и, возможно, соответствует доплейстоценовому разделению сибирской и приморской форм. Приморские углозубы генетически значительно более изменчивы, чем сибирские (2.49 и 1.38% соответственно). Это согласуется с ранее опубликованными данными [10, 11]. Высокий уровень внутри- и межпопуляционного полиморфизма в выборках из Приморского края указывает на длительное существование локальных популяций углозуба в южном Приморье в демографически стабильных условиях, что подтверждается полимодальным характером распределения попарных расстояний (рис. 4). Это же объясняет и структура медианных сетей для приморской клады – наличие нескольких значительно обособленных друг от друга гаплотипов (рис. 5), возможно, соответствует длительной дифференциации отдельных популяций в локальных микрорефугиумах. Уникальная история, высокое биологическое разнообразие и биогеографические особенности Приморского края связаны с реликтовым характером этого рефугиума. Из всех континентальных территорий восточной части России он был наименее затронут плейстоценовыми оледенениями, сохранив автохтонную батрахофауну. Горная местность способствовала изоляции отдельных популяций и формированию высокого межпопуляционного разнообразия.

Современное распространение вида предполагает наличие минимум двух автохтонных центров формирования филетических ветвей сибирского углозуба. Одним из них является, вероятно, южная часть Приморского края и прилегающие территории Северной Кореи и южной Маньчжурии, где происходило становление приморской формы. Не совсем понятно, где и когда произошло разделение предковой формы сибирского углозуба. Вероятно, это событие могло быть связано с постепенной аридизацией и изменениями климата континентальной части Маньчжурии в плейстоцене.

Территория от Хинганского хребта до междуречья Амура, Сунгари и Уссури может рассматриваться как предполагаемое место формирования популяций, давших начало линии, колонизировавшей основную часть современного видового ареала, – сибирской форме. Незначительное разнообразие гаплотипов в популяциях сибирской формы из основной части ареала свидетельствует о вероятном резком сокращении численности с последующим быстрым ее увеличением. По сравнению с приморской формой для сибирской формы характерно строго унимодальное распределение частот попарных расстояний, причем мода распределения сильно смещена в сторону наименьших различий (рис. 3), что интерпретируется как недавняя экспансия линии, приведшая к быстрому росту численности популяции [12, 22]. Это предположение подтверждается и характером структуры медианной сети гаплотипов (рис. 5): структура плохо читается – заметны три центральных гаплотипа, встречающихся с максимальной частотой, и большое количество единичных или крайне редких гаплотипов, отличающихся на несколько замен от центральных. Среди более обособленных гаплотипов можно назвать выявленные для популяций из Внутренней Монголии, Сахалина и Читинской области.

Необходимо отметить обособленное положение островных популяций углозуба с Хоккайдо и Южных Курил. Они формируют кластер близких гаплотипов, определенно относящийся к сибирской форме, но достаточно заметно отстоящий (“длинная ветвь”). Подобного рода картина предполагает достаточно давнюю колонизацию островов с материка (по всей видимости, через Сахалин) и дальнейшее обособление. Изоляция и небольшой размер островных популяций могли способствовать накоплению мутаций. Обнаруженный нами значительный уровень генетической обособленности этих популяций от всех остальных популяций сибирской клады сочетается с их биохорологической спецификой [30].

Таким образом, полученные данные по молекулярной дифференциации двух форм сибирского углозуба свидетельствуют о принципиально

разной демографической истории этих филетических линий. В то время как приморская форма характеризуется продолжительной демографической стабильностью при небольшом занимаемом ареале и высокой дивергенцией между отдельными гаплотипами, сибирская форма при громадной области распространения обладает явно выравненным в ходе предполагаемого “бутылочного горлышка” генофондом и лишь островные популяции демонстрируют некоторую обособленность. Характер распределения попарных различий указывает на недавний быстрый рост численности, а обширный ареал – на его стремительную колонизацию. Наиболее интересными вопросами нам представляются пути и механизмы этого процесса.

Взаимосвязи между центрами формирования разных ветвей *S. keyserlingii* пока неясны, возможно, они соответствуют центрам формирования таежного пояса северной Палеарктики [31]. Незначительный уровень морфологического полиморфизма вида и наблюдаемая молекулярная дифференциация при столь обширном ареале свидетельствуют, что большую его часть сибирский углозуб колонизировал за сравнительно краткий срок. Более того, относительно более низкое гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие сибирской формы свидетельствует о предшествующем сокращении численности (т.е. “бутылочного горлышка”), в ходе которого могла произойти сортировка генеалогических линий, так что в результате осталось лишь несколько близких гаплотипов. Это событие могло быть связано с плейстоценовыми колебаниями климата, в ходе которых Северное Полушарие периодически покрывалась ледниками. В последний гляциальный максимум большая часть современного ареала вида была представлена холодными и сухими местообитаниями – тундрами и тундростепями, в Сибири имелось большое число локальных, особенно горных оледенений (см., например, [32]), препятствовавших преодолению амфибиями водоразделов. С другой стороны, в связи с периодическими колебаниями уровня мирового океана формировались мосты суши, которые позволяли колонизировать острова. Только в течение последних 250 тыс. лет в Сибири было по крайней мере три критических периода похолоданий и падения уровня моря и около 19 локальных пиков падения температуры [32]. Вероятно, наблюдаемая дифференциация сибирских популяций является результатом повторяющихся процессов колонизации углозубом новых территорий в межледниковья и последующих отступлений в более умеренные пояса в новые пики оледенения.

В этом случае можно предположить, что популяции из южных частей сибирского ареала (Монголия и, очевидно, Северная Маньчжурия) оказались наименее затронутыми ледниковыми влияниями. Кроме того, учитывая уникальные температурные

адаптации сибирской формы, допустима возможность постепенной колонизации южной кромки пояса тундр и тундростепей в течение большей части плейстоцена. Это предположение подтверждается наблюдаемой топологией кладограммы: в пределах сибирской клады наиболее базальные ветви гаплотипов, видимо, соответствуют двум первичным путям плейстоценовой колонизации, один из которых (западный) привел к колонизации всей Сибири, а второй (восточный) – Сахалина.

Также обращает на себя внимание наличие двух разных линий гаплотипов на Сахалине – особи из северной части острова надежно группируются вместе с сибирскими гаплотипами, а гаплотипы, выявленные у углозубов из южной части Сахалина, занимают несколько более базальное положение в сибирской кладе. Сахалин, Хоккайдо и южные Курильские острова теоретически могли быть колонизованы в разные периоды, так как в течение последних 2 млн. лет острова и континент контактировали неоднократно. Очевидно, на Хоккайдо, а затем на Южные Курилы углозубы попали с Сахалина. По-видимому, их обособление от сахалинской географической популяции произошло раньше, чем обособление Сахалина от материка. Этим можно объяснить более сильные генетические отличия сахалинских углозубов от хоккайдских и южнокурильских, чем от материковых.

Однако большую часть ареала – северную и центральную Сибирь, а также, по всей видимости, западную часть ареала – сибирский углозуб занял после последнего оледенения (в пределах 25000 лет). При этом по всей северной Сибири обнаружено крайне низкое разнообразие гаплотипов, что, видимо, связано с быстрой колонизацией этих территорий в течение последнего межледниковья. Согласно представлению Г. Хьюитта [33], процесс колонизации видом новой территории можно представить как постоянную череду повторяющихся “бутылочных горлышек”, связанных с тем, что находящиеся на самом краю ареала популяции постоянно испытывают эффект изоляции в виду возможного затруднения обмена генами с основной частью ареала. Это явление, известное под названием эффекта передового края (the leading edge effect), является удобной гипотезой, объясняющей крайнюю генетическую обедненность распространяющегося в межледниковье вида, в нашем случае – при распространении популяций сибирского углозуба на север и запад.

Возможно, после конца пика последнего оледенения прежде всего были колонизованы территории Восточной Сибири, а затем направления колонизации разделились на западный (к Уралу) и восточный (к Берингии и Камчатке, включая северо-курильский о. Парамушир) (см. рис. 6). Учитывая малую подвижность сибирского угло-

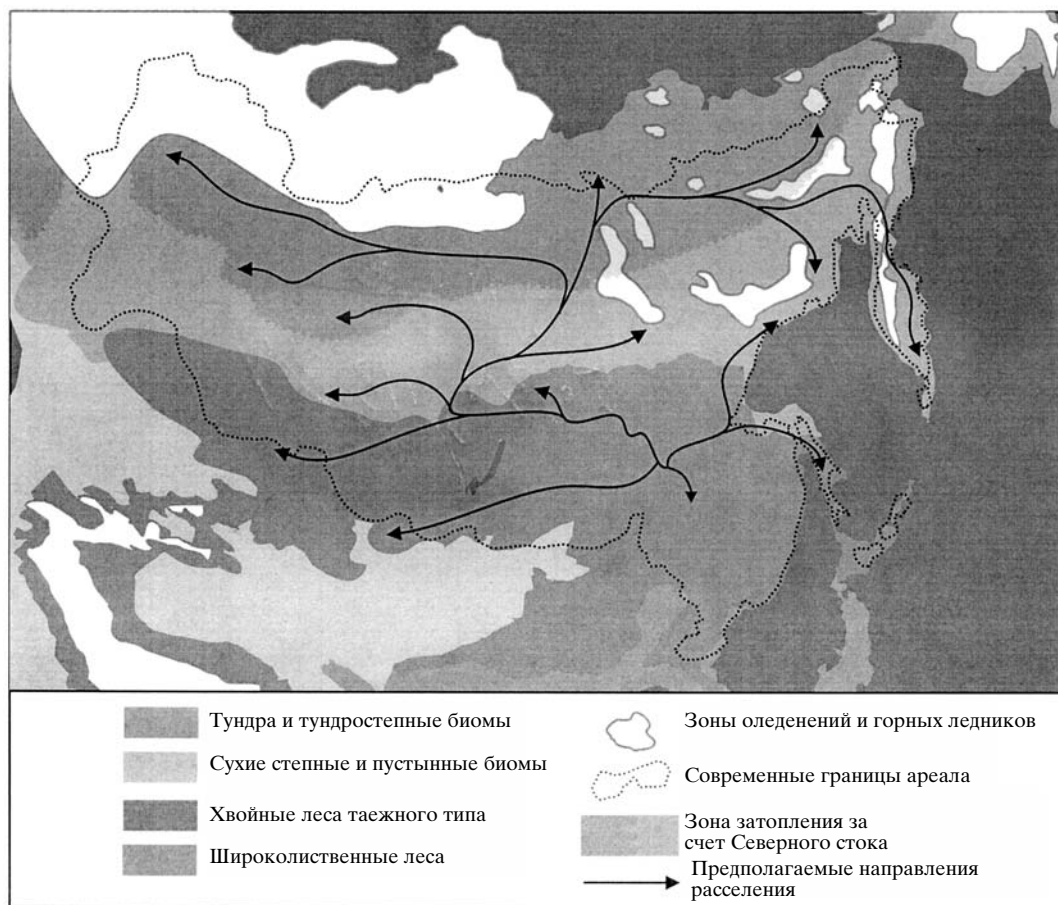


Рис. 6. Современное распространение *Salamandrella* и возможные пути колонизации ареала сибирской формой *Salamandrella keyserlingii* в конце последнего оледенения (25 тыс. лет назад). Показаны границы непригодных для углозуба местообитаний (зоны оледенений и тундростепные биомы), а также зона затопления за счет затрудненного стока северных рек в Северный Ледовитый океан и предполагаемые пути колонизации.

зуба, представляется важным понять механизмы его распространения по столь большой территории и в столь краткий срок. На наш взгляд, существенную роль в этом процессе могли играть факторы пассивного расселения углозубов – это прежде всего возможность сноса взрослых особей, личинок или икраемых мешков на север паводковыми водами и просто течением рек. И сегодня на северном пределе своего расселения сибирский углозуб встречается преимущественно по долинам рек [2]. Кроме того, стоит отметить, что после пика последнего оледенения сток рек Сибири в Северный Ледовитый океан был затруднен [32], что приводило к формированию системы заболоченных областей и озер у южной кромки ледника в Европе и Западной Сибири и по северу Восточной Сибири, так называемое Сибирское ледниковое озеро. Это обстоятельство, на наш взгляд, должно было особенно благоприятствовать быстрому расселению сибир-

ского углозуба из южной части восточной Сибири на север и далее по приполярным областям.

Картина дифференциации различных видов позвоночных на территории Сибири согласуется с нашим предположением. Так, например, имеющая обширный сибирский ареал землеройка *Sorex tundrensis* представлена тремя основными филетическими линиями, из которых лишь одна, по-видимому, распространилась по приполярным областям Сибири (неопубликованные данные А. А. Банниковой, личное сообщение, в печати). Поэтапное расселение с юга на север показано для байкальской хромосомной расы обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*), которая, по всей видимости, расселялась на север от Прибайкалья, заселяя территорию Восточной Сибири [34].

Таким образом, молекулярная изменчивость *S. keyserlingii* подтверждает гипотезу наличия двух первичных викарирующих рефугиев доплейстоценовой дифференциации общего предка

Salamandrella в юго-восточной части его современного ареала и поэтапного процесса колонизации большей части ареала сибирской формой. При этом колонизация островов Тихого океана, по всей видимости, шла в несколько этапов, что связано с повторяющимися этапами распространения и отступления на сибирской части современного ареала вида. В то же время расселение на северных и западных областях распространения происходило крайне быстро, что может объясняться ролью пассивных факторов распространения. Этот процесс колонизации сопровождался резким ростом численности популяции и падением генетического разнообразия, возможно, в связи с эффектом “передового края”.

Авторы выражают глубокую благодарность проф. Б.Д. Васильеву, М.В. Холодовой, Э.В. Андагулову, А.А. Банниковой, Хенку Валлайсу (Henk Wallays), Е.А. Дунаеву, Кодзи Ицзука (Koji Izuka), Л.В. Капитоновой, А.А. Колесникову, О.В. Колобаевой, Н.Н. Колобаеву, Масаки Куро-о (Masaki Kuro-o), С.М. Ляпкову, И.В. Масловой, А.Д. Пояркову, Ю.С. Равкину, И.А. Сербиновой, У.В. Симаковой, Н.А. Формозову, Цзэн Сяомао (Zeng XiaoMao) и Е. Яну.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Басарукин А.М., Боркин Л.Я. Распространение, экология и морфологическая изменчивость сибирского углозуба, *Hynobius keyserlingii*, на острове Сахалин // Экология и фаунистика амфибий и рептилий СССР и сопредельных стран. Л., 1984. С. 12–54.
2. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: КМК, 1999. 298 с.
3. Боркин Л.Я. Систематика // Сибирский углозуб. М: Наука, 1994. С. 54–80.
4. Воробьева Э.И., Антипенкова Т.П., Хинчлифф Дж. Р. Особенности развития конечностей у дальневосточной популяции сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Hynobiidae, Caudata) // Докл. РАН. 1999. Т. 364. С. 130–133.
5. Осташко Н.Г. О географической изменчивости сибирского углозуба *Hynobius keyserlingii* // Вопр. герпетологии. Л., 1981. С. 98.
6. Litvinchuk S.N., Borkin L.J. Variation in number of trunk vertebrae and counts of costal grooves in salamanders of the family Hynobiidae // Contr. Zool. 2003. V. 72. № 4. P. 195–209.
7. Мазин А.Л. Величина генома у некоторых хвостатых и бесхвостых амфибий Дальнего Востока // Герпетофауна Дальнего Востока и Сибири. Владивосток, 1978. С. 20–21.
8. Litvinchuk S.N., Borkin L.J., Rosanov J.M. Interspecific and intraspecific genome size variation in hynobiid salamanders of Russia and Kazakhstan: determination by flow cytometry // Asiat. Herpetol. Res. 2004. V. 10. P. 282–294.
9. Kuzmin S.L., Maslova I.V. The Amphibians of the Russian Far East. Sofia; Moscow: Pensoft, 2004. 464 p.
10. Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А. и др. Внутривидовая генетическая дифференциация сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Amphibia, Caudata) и криптический вид *S. schrenckii* с юго-востока России // Зоол. журн. 2005. Т. 84. № 11. С. 1374–1388.
11. Берман Д.И., Деренко М.В., Малярчук Б.А. и др. Генетический полиморфизм сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*, Caudata, Amphibia) в ареале и криптический вид углозуба *S. schrenckii* из Приморья // Докл. РАН. 2005. Т. 403. № 3. С. 427–429.
12. Avise J. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, 2000. 447 p.
13. Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates Publ., 1996. P. 1–655.
14. Palumbi S.R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction // Molecular Systematics. Sinauer Assoc. Publ., 1996. P.1–655.
15. Moritz C., Schneider C.J., Wake D.B. Evolutionary relationships within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation // Syst. Biol. 1992. V. 41. P. 273–291.
16. Fu J., Wang Y., Zeng X. et al. Genetic diversity of Eastern *Batrachuperus* (Caudata: Hynobiidae) // Copeia. 2001. P. 1100–1105.
17. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. P. 406–425.
18. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987.
19. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M. MEGA3: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Tempe, Arizona: Arizona State Univ., 2005.
20. Schneider S., Roessli D., Excoffier L. ARLEQUIN, Version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva (Switzerland), 2000.
21. Schneider S., Excoffier L., Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA // Genetics. 1999. V. 152. P. 1079–1089.
22. Rogers A.R. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. // Evolution. 1995. V. 49. P. 608–615.
23. Babik W., Branicki W., Cronbrnja-Isailovic J. et al. Phylogeography of two European newt species-discordance between mtDNA and morphology // Mol. Ecol. 2005. V. 14. P. 2475–2491.
24. Zhang P., Chen Y.Q., Zhou H. et al. Phylogeny, evolution, and biogeography of Asiatic Salamanders (Hynobiidae) // Proc. Natl Acad. Sci. 2006. V. 103. № 19. P. 7360–7365.
25. Caccione A., Milinkovitch M. C., Sbordoni V., Powell J.R. 1997. Mitochondrial DNA rates and biogeography in European newt species-genus *Euproctus* // Syst. Biol. V. 46. № 1. P. 126–144.
26. Carranza S., Amat F. Taxonomy, biogeography and evolution of *Euproctus* (Amphibia: Salamandridae), with the resurrection of the genus *Calotriton* and the description of a new endemic species from the Iberian Peninsula // Zool. J. Linn. Soc. 2005. V. 145. P. 555–582.

27. *Cracraft J.* Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation // *Speciation and Its Consequences*. Sunderland, MA, 1989. P. 28–59.
28. *Garcia-Paris M., Herrero P., Martin C. et al.* Morphological characterization, cytogenetic analysis, and geographical distribution of the Pygmy Marbled Newt *Triturus marmoratus pygmaeus* (Wolterstoff, 1905) (Caudata: Salamandridae) // *Bijdragen tot de Dierkunde*. 1993. В. 63. № 1. S. 3–14.
29. *Esprequeira Themudo G., Arntzen J.W.* Molecular identification of marbled newts and a justification of the *Triturus marmoratus* and *T. pygmaeus* species status // *Herpetol. J.* 2007. V. 17. (in press).
30. *Кузьмин С.Л., Сато Т., Накабаяси С. и др.* Сравнительный анализ экологии и распространения углозубов острова Хоккайдо // *Зоол. журн.* 2007. Т. 86. № 8. С. 945.
31. *Толмачев А.И.* К истории возникновения и развития темнохвойной тайги. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. 135 с.
32. *Марков К.К., Гричук М.П., Лазуков Г.И.* Основные закономерности развития природы территории СССР в четвертичном периоде (ледниковом периоде – антропогене). М.: Изд-во МГУ, 1961. Ч. 1. 173 с.
33. *Hewitt G.* The genetic legacy of the Quaternary ice ages // *Nature*. 2000. V. 405. P. 907–913.
34. *Поляков А.В., Ладыгина Т.Ю., Бородин П.М. и др.* Эволюция хромосом обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*, Soricidae, Lipotyphla) в Сибири и на Южном Урале // *Вест. ВОГиС*. 2001. Т. 16. С. 25.
35. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. P. 111–120.

Phylogeography of the Siberian Newt (*Salamandrella keyserlingii*) by Mitochondrial DNA Sequence Analysis

N. A. Poyarkov^a and S. L. Kuzmin^b

^a Department of Vertebrate Zoology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899 Russia;
e-mail: ipe51@yahoo.com

^b Severtsev Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia;
e-mail: poyarkov@orc.ru

Abstract—Differentiation of geographical populations of the Siberian newt *Salamandrella keyserlingii* throughout the species range was analyzed using a fragment of the cytochrome b gene. The population of the Primorye region (Russian Far East) is separated to the greatest extent; the Japanese and South Kuril populations are the next most separate. These populations are possibly subspecies. Geographical differentiation of populations in the Siberian part of the species range is lower, lacks a clinal variation, and is irregular. The molecular variation of *S. keyserlingii* supports the hypothesis that several primary vicarious refugia of pre-Pleistocene differentiation of a common ancestor of *Salamandrella* occurred in the southeastern part of its current distribution range and that northern and western regions were gradually colonized via repeated steps of expansion and retreat in the Siberian part of the modern species range.