

*На правах рукописи*



**Поярков Николай Андреевич**

**ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И СИСТЕМАТИКА  
ХВОСТАТЫХ АМФИБИЙ СЕМЕЙСТВА УГЛОЗУБОВ  
(AMPHIBIA: CAUDATA, HYNOBIIDAE)**

Специальность 03.02.04 – зоология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2010

Работа выполнена на кафедре зоологии позвоночных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Васильев Борис Дмитриевич**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Алёшин Владимир Вениаминович**  
Научно-исследовательский институт  
физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ

доктор биологических наук  
**Смирнов Сергей Васильевич**  
Институт проблем экологии и эволюции  
имени А.Н. Северцова РАН

**Ведущая организация:** Зоологический институт РАН

Защита диссертации состоится «6» декабря 2010 г. в «15» часов «30» минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.20 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, д. 1 стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1.

Факс: 8(495)939-17-46; E-mail: [irbeme@mail.ru](mailto:irbeme@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «  » октября 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



**И.Р. Бёме**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Представители семейства углозубов (*Hynobiidae*) занимают обособленное положение среди прочих хвостатых земноводных. Углозубы обладают большим количеством примитивных черт организации и, вероятно, наиболее близки к общему предку *Caudata*; среди рецентных форм они рассматриваются как прототип первых наземных позвоночных (Шмальгаузен, 1964). Вместе с *Cryptobranchidae* углозубов объединяют в подотряд *Cryptobranchioidea*, включающий наиболее примитивных рецентных представителей хвостатых амфибий. Принято считать, что монофилия *Hynobiidae* не вызывает сомнений, однако ряд авторов на основании морфологических (Trueb, Cloutier, 1991; Boisvert, 2009) и молекулярных (Wiens *et al.*, 2005) данных считает возможной парафилию группы. Палеонтологическая летопись семейства *Hynobiidae* крайне бедна, достоверно углозубы известны начиная с миоцена-плиоцена Казахстана и Европы (Averianov, Tjutkova, 1995; Venczel, 1999). Однако недавние находки криптобранхоидных амфибий из юры и раннего мела северного Китая демонстрируют значительное сходство с рецентными *Hynobiidae* (Wang, 2000; Zhang *et al.*, 2006; Chen, Gao, 2009), что предполагает длительную историю эволюции семейства *Hynobiidae* и делает актуальной проблему происхождения и диверсификации этой группы.

*Hynobiidae* обладают уникальным для амфибий кариотипом, демонстрируя большие (2n колеблется от 40 до 78) асимметричные бимодальные хромосомные наборы (Morescalchi, 1973, 1975, 1979). Изучение размера генома также показало значительный разброс между отдельными представителями семейства, хотя углозубы в этом отношении исследованы недостаточно (Olmo, 1973; Litvinchuk *et al.*, 2004). Весьма важно поэтому исследование эволюции карио- и цитогенетических признаков в семействе *Hynobiidae*.

В отличие от прочих групп *Caudata*, *Hynobiidae* встречаются почти исключительно на территории Азии. Для них характерны реликтовые разорванные ареалы, большая часть форм привязана к горным районам Восточной Азии. Группа может рассматриваться как модель для исследования исторической биогеографии Азии, а изучение филогении семейства поможет углубить понимание зоогеографии региона и влияние на эволюцию фауны кайнозойских орогенетических процессов и климатических изменений.

Сегодня в семействе *Hynobiidae* насчитывают около 50 видов, объединяемых в 8-10 родов, таким образом, это третье по видовому богатству семейство хвостатых (Frost, 2009). Результаты молекулярно-генетических и биохимических исследований последних десятилетий свидетельствуют о существенной недооценке разнообразия земноводных (Vieites *et al.*, 2009). Сложность морфологической диагностики углозубов заставляет предположить, что разнообразие *Hynobiidae* также недооценено, однако вопросы систематики этой группы могут быть однозначно решены только с применением молекулярных или биохимических методов (Matsui, 1987; Matsui *et al.*, 2000, 2001, 2002, 2004). Интенсивность таксономических исследований семейства очевидна: с 1983 года было описано 22 новых вида, 7 родов и 1 подсемейство, а ранг 4 форм был поднят до видового (Fei, Ye, 2000; Song *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Matsui *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Lai, Lue, 2008; Wei *et al.*, 2009). Наконец, исследования различных видовых комплексов указывают на наличие неописанных видов (Nishikawa *et al.*, 2001, 2003, 2005, 2007; Fu *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2008; Fu, Zeng, 2008). При этом единственная ревизия всего семейства *Hynobiidae* была опубликована в начале XX века (Dunn, 1923), что делает комплексное исследование систематики и таксономии углозубых весьма актуальным.

Наиболее масштабная попытка реконструкции филогении углозубов по полным последовательностям митохондриальной ДНК представителей 8 родов *Hynobiidae* (Zhang *et al.*, 2006) привела к новой схеме, которая, однако, обладала плохо разрешённой топологией, основывалась на анализе небольшого числа таксонов и противоречила ряду полученных ранее гипотез (Weisrock *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 2003). Последующие работы (Peng *et al.*, 2010) также окончательно не разрешили филогенетические связи *Hynobiidae*. Данные же по ядерной филогении углозубых пока отсутствуют. Комплексному исследованию филогенетических связей, разнообразия и систематики *Hynobiidae* и посвящена эта работа.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель работы состоит в комплексном изучении филогенетических связей представителей семейства Hynobiidae на различных таксономических уровнях и разработке адекватной классификации, отражающей эти связи. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Обобщить опубликованные и оригинальные данные о морфологической дифференциации Hynobiidae на родовом уровне, сопоставить их с данными по другим рецентным семействам Caudata и ряду ископаемых форм, провести филогенетический анализ по исследованным признакам.
2. Обобщить данные литературы о количестве и морфологии хромосом Hynobiidae; получить кариотипы ряда ранее неизученных видов; исследовать значения размера генома представителей основных филогенетических линий семейства.
3. Изучить филогенетические связи между представителями Hynobiidae по данным последовательностей мтДНК, максимально охватив разнообразие семейства.
4. Изучить филогенетические связи между представителями семейства Hynobiidae по данным последовательностей белок-кодирующих генов ядерного генома, сопоставить филогенетические гипотезы, полученные по данным мтДНК- и яДНК-маркеров.
5. На основе синтеза полученных результатов и литературных данных проанализировать эволюцию таксономически важных морфологических признаков, разработать систему семейства, отражающую результаты филогенетического анализа.
6. Изучить многообразие семейства Hynobiidae с помощью мтДНК-маркеров; исследовать внутривидовую дифференциацию надвидовых комплексов в родах *Onychodactylus*, *Salamandrella*, *Hynobius*, *Paradactylodon*; оценить применение гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (COI) как маркера для ДНК-идентификации Hynobiidae.
7. Используя методы молекулярных датировок, оценить возможные времена дифференциации различных линий семейства по мтДНК- и яДНК-маркерам; разработать палеогеографический сценарий, описывающий эволюцию Hynobiidae.

**Научная новизна.** Впервые на основании обширного оригинального материала, охватывающего всех известных представителей семейства (10 родов, 75 таксонов предположительно видового ранга), изучены филогенетические связи и разнообразие Hynobiidae. Исследование проводили на различных таксономических уровнях, причем как по мтДНК, так и по яДНК-маркерам. Установлены морфологические признаки, важные для диагностики видов и родов семейства Hynobiidae. Получены новые данные по хромосомным наборам и размеру генома 18 видов из 6 родов. Исследована филогеография ряда видовых комплексов. С помощью молекулярно-генетического анализа выявлено 19 предположительно новых для науки форм околотовидового ранга, а также 12 группировок родового и надродового ранга. На основании молекулярных датировок кладогенетических событий в истории семейства выдвинута новая гипотеза о возможных путях эволюции и закономерностях дифференциации Hynobiidae. Предложена новая система Hynobiidae, снабженная списками синонимов, таксономическими очерками и оригинальным определительным ключом по всем видам семейства. Оценена практическая применимость гена COI для молекулярной идентификации Caudata.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Данные диссертации по филогении и систематике Hynobiidae могут быть полезны при проведении сравнительных исследований проблем видообразования у земноводных, исторической биогеографии и зоогеографии Азии, а также использоваться в вузовских курсах общей зоологии, зоологии позвоночных и герпетологии. Диагностические таблицы применимы при определении в полевых условиях, а также в зоологических коллекциях. Использование методов молекулярной ДНК-идентификации животных необходимо для адекватной оценки биологического разнообразия и разработки соответствующих природоохранных мер. Наши данные позволяют пересмотреть природоохранный статус большинства видов Hynobiidae и могут использоваться в дальнейшем при инвентаризации и мониторинге разнообразия батрахофауны.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований были представлены в виде докладов и стендовых презентаций на 7 международных и 3 российских конференциях: X, XI и XII Международных конференциях студентов и молодых ученых «Ломоносов-2003»,

«Ломоносов-2004», «Ломоносов-2005» (Москва, МГУ), II и III съездах Герпетологического общества им. А.М. Никольского при РАН (Санкт-Петербург, 2003; Пушкино-на-Оке, 2006), 12-м (Санкт-Петербург, 2003), 13-м (Бонн, ФРГ, 2005), 14-м (Порту, Португалия, 2007) и 15-м (Кушадасы-Айдын, Турция, 2009) конгрессах Европейского герпетологического общества и на Съезде герпетологов и террариумистов (Герпетологическое общество Германии) (Герсфельд, ФРГ, 2005). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных семинарах в Национальном музее естественной истории «Naturalis», Лейден, Нидерланды (2006, 2008), Свободном университете Брюсселя, Бельгия (2006), Биологическом институте г. Ченьду, КНР (2006), Зоологическом институте г. Куньмин, КНР (2006, 2007), Университете г. Хироаки, Япония (2008), Музее зоологии позвоночных при Калифорнийском университете, Беркли, США (2008), Институте биоразнообразия Онтарио, Гвелф, Канада (2008), Тайбэйском педагогическом университете, Тайбэй, Тайвань (2009). Работа апробировалась на семинарах лаборатории герпетологии и орнитологии ЗИН РАН (2010) и кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ (2009–2010).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 32 печатные работы, в том числе 7 статей, из которых 4 — в журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из разделов: «Введение», четырех глав: «Основные проблемы происхождения и систематики углозубов (Hynobiidae)», «Материалы и методы исследования», «Филогенетические связи представителей семейства Hynobiidae» и «Систематика и пути эволюции семейства Hynobiidae», «Выводы», «Список литературы» (включающий 1001 источник, из них 861 на иностранных языках) и семи «Приложений». Общий объём работы — 650 страниц машинописного текста, из них — 290 страниц — сам текст работы, и 360 страниц «Приложений». Работа содержит 20 таблиц и 60 рисунков. Приложения содержат дополнительные результаты диссертации, 19 таблиц и 33 рисунка.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ВВЕДЕНИЕ

Во Введении обоснована актуальность темы, сформулированы основные цели и задачи настоящего исследования.

### ГЛАВА I. ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И СИСТЕМАТИКИ УГЛОЗУБОВ (HYNOBIIIDAE)

В главе приводится краткий обзор наиболее актуальных проблем филогенетики и систематики Hynobiidae. Полный обзор литературы по истории таксономических и филогенетических исследований семейства приводится в Приложении 1.

**I.1. Наиболее актуальные проблемы систематики Hynobiidae на надродовом уровне – уровне семейства.** В разделе рассматриваются основные проблемы таксономической структуры семейства Hynobiidae, родовой систематики и филогенетических связей между основными группами углозубых.

**I.2. Наиболее актуальные проблемы систематики Hynobiidae на видовом и подвидовом уровнях.** В разделе рассмотрены основные проблемы видовой и внутривидовой систематики углозубых и обозначены наименее изученные в таксономическом отношении роды и видовые комплексы.

### ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**II.1. Материалы исследования.** Исследование проводили с 2003 по 2009 год. Экспедиционную работу и сбор материала осуществляли на территории России, Казахстана, Ирана, Китая, Тайваня и Японии. Помимо этого были обработаны материалы герпетологических коллекций 16 зоологических музеев и университетов. Всего в ходе исследований морфологии изучено 2523 особи, в том числе количество туловищных позвонков у 650 особей. Было кариотипировано 35 особей 13 видов, а размер генома определен для 102 особей 19 видов. В молекулярном анализе помимо собственных сборов использовали материал, любезно предоставленный коллегами, и из музейных коллекций. В общей сложности в анализе

участвовало 1367 особей из 316 локалитетов, относимых к 75 филогенетическим линиям, представляющим все признаваемые сегодня виды Hynobiidae за исключением *H. turkestanicus*.

**II.2. Методы исследования.** Кладистический анализ морфологических признаков проводили с целью (а) уточнения филогенетических связей между современными родами Hynobiidae и (б) уточнения положения Hynobiidae относительно остальных рецентных семейств и ряда вымерших групп хвостатых амфибий. Для решения последней задачи за основу была взята таксон-признаковая матрица из 281 морфологического признака (Wiens *et al.*, 2005), которая была дополнена состояниями признаков для 13 таксонов Hynobiidae, представляющих все роды семейства. В матрицу был включен 151 анатомический и кариологический признак (Dunn, 1923; Duellman, Trueb, 1986; Zhao *et al.*, 1988; Adler, Zhao, 1990; Trueb, Cloutier, 1991; Fei *et al.*, 2006; Sessions, 2008 и др.), а также 57 оригинальных признаков внешней морфологии и 43 признака, описывающих особенности размножения и развития углозубых. Последний массив данных использовали для выявления филогенетических связей между родами Hynobiidae. В общей сложности в анализе участвовало 532 признака. При описании признаков внешней морфологии были отобраны 26 наиболее информативных признаков (из них 10 метрических признаков тела, 13 метрических признаков головы и 3 меристических признака), широко применяемых в систематике и видовой диагностике хвостатых амфибий (Good, Wake, 1992; Wilson, Larson, 1999; Nishikawa *et al.*, 2007). Подсчет числа костальных бороздок проводили по Y. Misawa (1989), а туловищных позвонков — с помощью рентгенограмм (540 экземпляров) или при вскрытии (110 экземпляров, по: Litvinchuk, Borkin, 2003). Также описывали 23 качественных признака окраски, их состояния кодировали (по: Tominaga *et al.*, 2005, с изменениями).

Сбор и хранение материалов для молекулярного и цитогенетического анализа проводили по стандартным методикам. Размер генома (количество ядерной ДНК в диплоидном ядре) измеряли при помощи проточной цитофотометрии на базе лаборатории цитогенетики человека и животных ИХБФМ СО РАН и KIZ CAS, данные обрабатывали по стандартным методикам (Виноградов и др., 1990; Murphy *et al.*, 1997; Litvinchuk *et al.*, 2004). В качестве реперного стандарта использовали периферические клетки крови одних и тех же особей *Pleurodeles waltl*, *Triturus karelinii* (Salamandridae) и *Rana temporaria* (Ranidae). Анализ числа и морфологии хромосом проводили в сотрудничестве с лабораторией проф. М. Куро-о на базе Университета Хиросаки, Япония, по стандартным методикам (Kezer, Sessions, 1979, с изменениями).

Молекулярно-генетический анализ осуществляли на базе нескольких лабораторий, в том числе кабинета молекулярных методов каф. зоологии позвоночных биологического ф-та МГУ, кабинета молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, лаборатории Музея зоологии позвоночных Калифорнийского университета (MVZ, UC, Berkeley) и Канадского центра ДНК-Штрихкодирования (CCDB, BIO, Guelph). Выделение ДНК проводили четырьмя различными методиками (Sambrook *et al.*, 1989; Bruford *et al.* 1992; Ivanova *et al.*, 2006), затем концентрацию ДНК выравняли до 100 ng/ $\mu$ L на спектрофотометре *NanoDrop*.

При разработке праймеров, филогенетическом анализе полученных последовательностей мтДНК, а также в качестве внешних групп использовали ранее опубликованные полные последовательности мтДНК хвостатых амфибий: 23 мтДНК-генома для Hynobiidae (Zhang *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2010), а также 16 мтДНК-геномов представителей других семейств Caudata. При филогенетических реконструкциях на уровне семейства в качестве мтДНК-маркеров применяли только белок-кодирующие гены Н-цепи, исключая некодирующие участки и гены тРНК и рРНК (общая длина 16750 п.о., окончательное выравнивание 10937 п.о.). При филогеографических реконструкциях и исследованиях на уровне родовой филогении исследовали фрагменты гена цитохрома b (*cyt b*; 818-1152 п.о.), 12S рРНК, (*12S rRNA*; 267-1138 п.о.), 16S рРНК (*16S rRNA*; 538-1085 п.о.), первой субъединицы цитохром с-оксидазы (*COI*; 655 п.о.), первой и второй субъединиц гена NADH-дегидрогеназы (*ND1*, *ND2*; 1467 п.о.). Для амплификации фрагментов мтДНК всего использовали комбинации из 53 праймеров, из которых 5 — оригинальные. В качестве яДНК-маркеров исследовали высококонсервативные однокопийные ядерные белок-кодирующие гены: первая субъединица гена активации рекомбинации (*RAG1*; 1460 п.о.), ген нейротропного фактора мозга (*BDNF*; 715 п.о.) и ген проопиомеланокортина (*POMC*; 540 п.о.). Для их амплификации применяли комбинации из 16 праймеров, из которых 8 — оригинальные.

ПЦР, визуализацию и очистку ампликонов и определение первичных нуклеотидных последовательностей (секвенирование) проводили по стандартным методикам (Hillis *et al.*, 1996). В общей сложности для реконструкции филогении семейства Hynobiidae автором было получено 413 последовательностей, и 256 были заимствованы из генбанка NCBI, из которых 151 уникальных. Для исследований филогении внутриродового уровня было получено 1883 последовательности, и 616 последовательностей было получено из генбанка или предоставлено коллегами. Ранее ядерная филогения углозубых не изучалась, поэтому все полученные 137 последовательностей являются оригинальными.

**II.3. Анализ исследованных признаков.** Кладистический анализ морфологических данных проводили с использованием программ PAUP v.4.0b10; MrBayes v.3.0b3 и WinClada v.1.0. Филогенетический анализ осуществляли по всему массиву признаков и таксонов для выявления положения углозубов среди прочих Caudata, а также отдельно по признакам, применяемым в систематике Hynobiidae. В первом случае в качестве внешней группы использовали *Karaurus sharovi* (Karauridae), а во втором — сестринское углозубам семейство Cryptobranchidae. Большинство сравниваемых признаков были бинарными, кроме 99, которые ординовались. Для минимизации влияния пedomорфных изменений на филогенетические гипотезы было выделено 72 потенциально пedomорфных признака; анализ проводили как с включением их в анализ, так и без них. Для формирования адекватной полярности исследуемых признаков, исходя из известных филогенетических связей между рецентными группами хвостатых амфибий (Larson *et al.*, 2003; Wiens *et al.*, 2005; Zhang, Wake, 2009), на результирующие филогенетические гипотезы накладывали топологические ограничения. Реконструкция кладограмм выполнена методом максимальной экономии (MP) и байесовским методом (UBA). Статистическую обработку морфометрических данных проводили в программах Microsoft Excel и StatSoft Statistica v.6.0. Для минимизации фактора размера животного абсолютные значения признаков нормировали к длине туловища. С помощью стандартных параметрических тестов оценивали сопряженность признаков, выраженность полового диморфизма и достоверность различий по морфометрическим признакам. Скоррелированные признаки исключали из дальнейшего анализа. Для выявления дифференциации между популяциями использовали канонический детерминантный анализ (CDA) и многогрупповой анализ главных компонент (MGPCA).

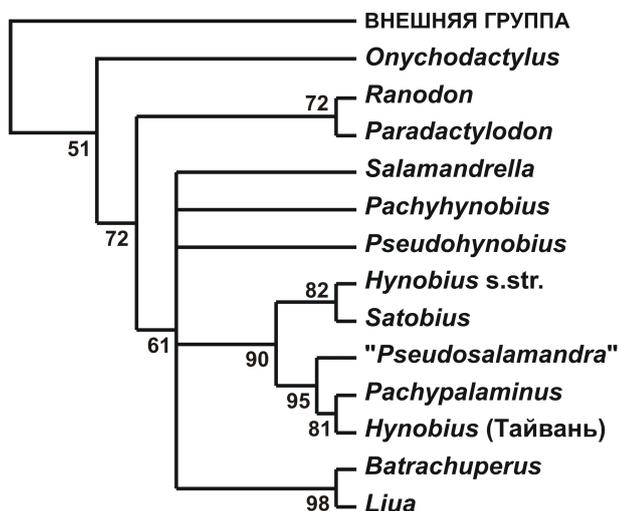
Для обработки молекулярных данных применяли 18 различных пакетов программ. После первичного анализа и выравнивания последовательностей (Chromas 1.45; BioEdit 7.0.5.2; Clustal X 1.8 и др.) проводили анализ положения стоп-кодона и делеций. Последовательности яДНК также анализировали на возможность наличия гетерозигот, однако из 157000 исследованных было выявлено лишь 19 сайтов, потенциально гетерозиготных по двум основаниям. Дополнительно проводили оценку различий нуклеотидного состава как мтДНК, так и яДНК-маркеров; несмотря на достоверные различия, они не оказывают решающего влияния на филогению. Производили оценку насыщения фрагментов мтДНК и яДНК (DAMBE v.4.2.13). В мтДНК трансверсии по третьей кодон-позиции вносят наибольший вклад в снижение уровня филогенетического разрешения (Mueller *et al.*, 2004), что учитывали при реконструкции филогении на уровне семейства и при выборе оптимальной модели эволюции. По маркерам яДНК существенных следов насыщения не выявлено ни по одной из кодон-позиций. Статистический анализ согласованности филогенетического сигнала между мтДНК и яДНК не позволил провести совместный анализ данных мтДНК и яДНК. Выбор адекватной модели эволюции ДНК, расчет генетических дистанций и построение филогении проводили независимо для прямых нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей ДНК в программах Modeltest v.3.06; MrModeltest v.2.2; PAUP v.4.0b10; MEGA 4.1 и Treefinder. МтДНК-геном был разбит на 42 партиции, для каждой из которых выбор оптимальной модели проводили независимо. Для нуклеотидных последовательностей мтДНК применяли модели  $GTR+\Gamma_4$  и  $GTR2+\Gamma_4$ . Для аминокислотных последовательностей мтДНК использовали модель  $mtREV+\Gamma_4$ . Последовательности 3 ядерных генов были разбиты на партиции по кодон-позициям и генам, для каждой из них были рассчитаны оптимальные модели и параметры, в конечном итоге в анализе участвовали 8 партиций. Топологию дендрограмм вычисляли тремя алгоритмами: дистанционным методом (ближайшего соседа, NJ), кладистическими методами (максимальной

экономии, *MP*; максимального правдоподобия, *ML*) и с помощью байесовского анализа (байесовский анализ по партициям, *PBA*). Устойчивость узлов дендрограмм оценивали по значениям бутстрэп-поддержек (*BS*) и апостериорных вероятностей (*PP*). Проводили оценку стабильности скоростей эволюции мтДНК и ядерных генов и относительных скоростей в различных линиях *Caudata* (с помощью *BRRT*, в программе *Cadence v.1.08*). Для оценки предположительного времени кладогенетических событий в эволюции *Hynobiidae* применяли анализ «молекулярных часов». Мы использовали 2 калибровки максимального возраста кладогенетических событий (дивергенция *Batrachia* и дивергенция *Urodela*; по Marjanović, Laurin, 2007) и 7 калибровок минимального возраста по находкам ископаемых форм земноводных (из которых 3 относятся к дифференциации *Cryptobranchoidea*, 3 охватывают дифференциацию *Salamandroidea*, а 1 отражает дивергенцию между *Anura* и *Caudata*). Время дивергенции оценивали по множественному байесовскому алгоритму калибровки в пакете программ *MULTIDIVTIME v.03*, с использованием свободных молекулярных часов (*relaxed clock*). Биогеографический анализ проводили в программе *Lagrange 1.0*, предоставляющей оценки максимального правдоподобия для альтернативных биогеографических сценариев. По данным работ по палеогеографии Азии (конец мезозоя — кайнозой) были сконструированы схемы, описывающие изменения географии Азиатского континента с середины мела до голоцена; на их основе разработан оригинальный сценарий эволюции *Hynobiidae*. Филогеографический анализ, расчет демографических и популяционно-генетических параметров и построение медианных сетей гаплотипов проводили в пакетах программ *Arlequin v.3.1* и *Network 4.111*.

### ГЛАВА III. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА HYNOBIIIDAE

**III.1. Филогенетические связи представителей семейства *Hynobiidae* по данным кладистического анализа морфологических признаков.** Из 532 исследованных признаков 53 признака не были изменчивы, а 130 – оказались филогенетически неинформативны, из 349 оставшихся признаков 282 оказались изменчивы среди *Cryptobranchoidea*. При филогенетических реконструкциях получены деревья длиной от 614 до 1902 шагов. Исключение из анализа 73 пedomорфных признаков приводило к падению уровня поддержки большинства узлов кладограммы, но не к топологическим изменениям. Результаты филогенетического анализа монофилию подотряда *Cryptobranchoidea* не подтверждают. Положение большинства включенных в анализ ископаемых форм неопределенно, кроме рода *Chunerpeton*, являющегося сестринской группой к *Cryptobranchidae*, и *Liaoxitriton*, который достаточно надежно группируется с *Hynobiidae*. Семейство *Hynobiidae* монофилетично (*BS*=51%), причем наиболее базальное положение занимают роды *Onychodactylus* и *Liaoxitriton* (рис. 1). Все остальные роды составляют монофилетическую группу (*BS*=72%), в которой сперва отделяется клада, объединяющая западноазиатские роды *Ranodon* и *Paradactylodon* (*BS*=72%), а затем клада, объединяющая *Batrachuperus* и *Liua* (*BS*=97%). Последнее объединение, вероятно, связано с тем, что эти роды являются наиболее водными и более подвержены пedomорфным изменениям, чем прочие группы *Hynobiidae*. Филогенетическое положение *Pseudohynobius*, *Salamandrella* и *Pachyhynobius* неразрешено, а представители рода *Hynobius* образуют монофилетическую группу (*BS*=90%), которая подразделяется на две клады — «прудовых» (подроды *Satobius*, *Hynobius* s. str.) и «ручьевых» углозубов (*Pseudosalamandra*, *Pachypalaminus*, *Hynobius* Тайваня).

**III.2. Филогенетические связи представителей семейства *Hynobiidae* по данным последовательностей митохондриальной ДНК.** Средние генетические дистанции между родами углозубых варьируют от 0.140 (*p*-дистанция) между родами *Batrachuperus* и *Liua* до 0.228 между родами *Protahynobius* и *Onychodactylus*. Дистанции между *Onychodactylus* и другими родами углозубых (*Hynobiidae* s. str.) достигают скорее уровня дистанций между семействами хвостатых амфибий, чем родового уровня, даже превышают дистанции между родственными семействами хвостатых амфибий (например, *Ambystomatidae* и *Dicamptodontidae*, 0.219). Была выявлена глубокая внутриродовая дифференциация в родах *Liua*, *Pseudohynobius* и *Paradactylodon*. Максимальные внутриродовые различия наблюдались при сравнении двух видов *Paradactylodon* — *P. gorganensis* и *P. mustersi* (они достигают 0.145 и превышают минимальную



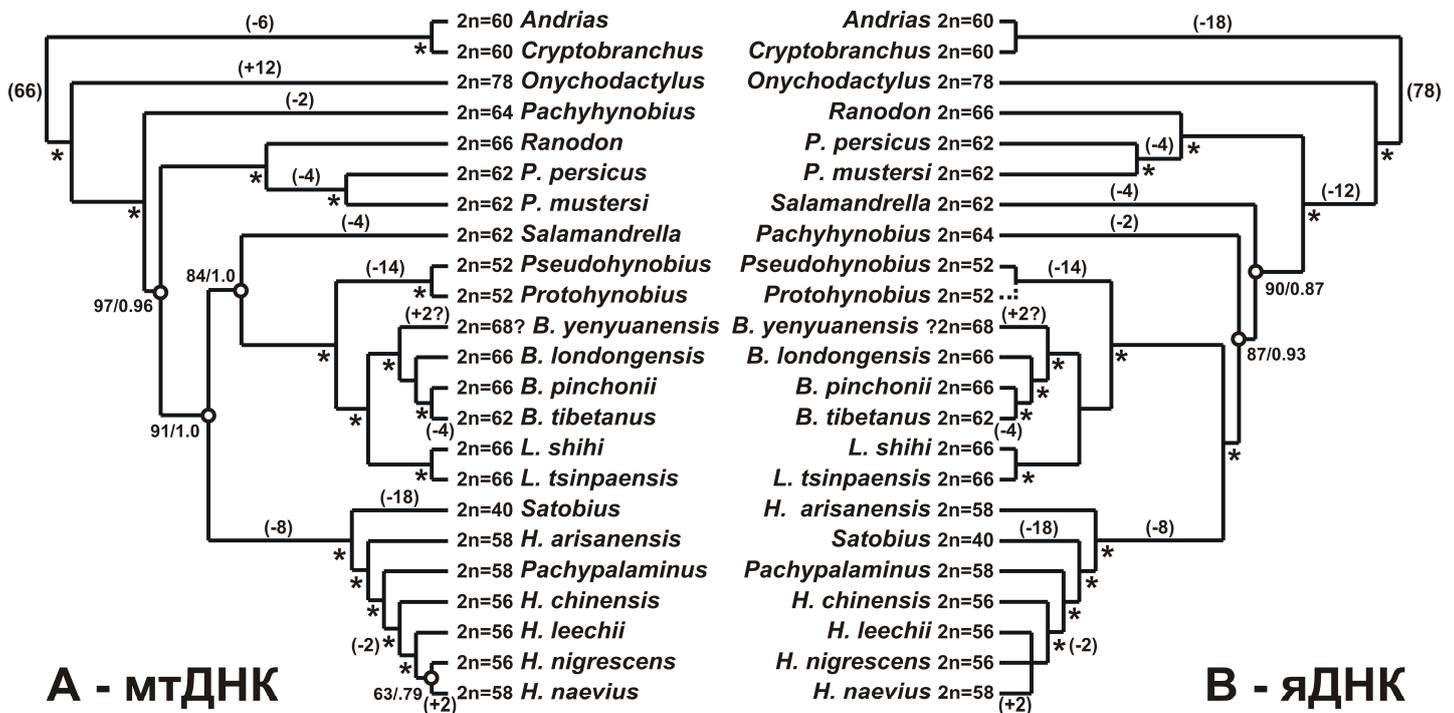
**Рис. 1.** Филогенетические связи между рецентными представителями Hynobiidae по данным анализа 349 морфологических признаков; даны значения BS-поддержек.

междуродовую дистанцию (0.140 между *Batrachuperus* и *Liua*). При проведении межвидовых сравнений в пределах рода *p*-дистанции колеблются от 0.01 (при сравнении между близкими формами рода *Hynobius*: *H. guabangshanensis* и *H. chinensis*, *H. tenuis* и *H. hidamontanus* и др.) до 0.12 – 0.13 (ряд видов *Onychodactylus*, *Paradactylodon* и *Pseudohynobius*).

Филогенетические схемы, полученные при анализе нуклеотидных и аминокислотных последовательностей мтДНК, обладали несколько

различной топологией; противоречия между ними касались тех узлов филогенетического дерева, которые были слабо поддержаны статистически. Максимальным уровнем филогенетического разрешения и топологической стабильностью обладает схема, построенная по данным анализа аминокислотных последовательностей по модели *mtREV+Г<sub>4</sub>*. Этой схеме мы и отдаем предпочтение при интерпретации филогенетических гипотез по данным мтДНК (рис. 2). Она предполагает филогенетическую обособленность *Onychodactylus* и монофилию группы Hynobiidae s. str. В ее пределах базальное положение занимает *Pachyhynobius*, а остальные роды распадаются на две монофилетические клады: западноазиатских (*Ranodon* и *Paradactylodon*) и восточноазиатских (все остальные роды) углозубых. Последняя группа также состоит из двух клад: рода *Hynobius* и объединения западнокитайских (*Liua*, *Batrachuperus*, *Protohynobius* и *Pseudohynobius*) и сибирских (*Salamandrella*) углозубов. Анализ обширного массива данных мтДНК показал несоответствие современной таксономии Hynobiidae выявленным филогенетическим группировкам. Хотя все роды семейства оказались монофилетическими, традиционная таксономическая структура рода *Hynobius* — самого большого рода семейства — явно противоречит его филогенетической структуре. Результаты нашего филогенетического анализа отличаются от опубликованных ранее (Larson *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2010). Отличия касаются тех узлов, которые были слабо или недостоверно поддержаны в предыдущих исследованиях. Причинами топологических противоречий могут быть, в том числе, объем анализируемых данных, а также молекулярные маркеры и алгоритмы филогенетического анализа. Данные анализа мтДНК не позволяют абсолютно разрешить филогенетические связи между группами *Pachyhynobius*, *Ranodon* — *Paradactylodon* и остальными родами Hynobiidae s. str. Возможно, дифференциация предка Hynobiidae s. str. на эти три линии произошла в короткий эволюционный промежуток времени, и мтДНК-геном принципиально неспособен однозначно разрешить отношения между ними; для этого необходимо привлечение данных яДНК.

**III.3. Филогенетические связи представителей семейства Hynobiidae по данным последовательностей ядерной ДНК.** Как и ожидалось, исследованные маркеры яДНК оказались значительно более консервативными, чем в случае мтДНК. При сравнении нуклеотидных последовательностей гена RAG1 представителей разных семейств отряда Caudata генетические дистанции варьируют от 0.06–0.13, при сравнении Hynobiidae с другими семействами минимальная дистанция наблюдалась между *Andrias* (Cryptobranchidae) и *Onychodactylus* (0.073). Сравнения в пределах Hynobiidae выявили минимальные генетические дистанции между родами *Liua* и *Batrachuperus* (0.011) и родами *Liua* и *Pseudohynobius* (0.011), а максимальная обнаруживается между родами *Onychodactylus* и *Pachyhynobius* (0.065) (что превышает минимальную дистанцию между семействами:  $p = 0.060$ ). Это подтверждает значительную эволюционную обособленность рода *Onychodactylus* и свидетельствует о глубокой дифференциации углозубых. Максимальные дистанции при внутривидовых сравнениях выявлены в родах *Paradactylodon* и *Hynobius*. При внутривидовых сравнениях, как правило, наблюдалось значительное генетическое единообразие, исключения составили криптические формы из комплекса *O. fischeri* (*p*-дистанции варьируют от 0.00 до 0.003).



**А - мтДНК**

**В - яДНК**

**Рис. 2.** Общие схемы филогенетических связей представителей Hynobiidae по данным анализа мтДНК (А) и яДНК (В). Звездочкой (\*) обозначены узлы с максимальной статистической поддержкой (BS>97%, PP>0.97); кружком обозначены узлы с умеренной поддержкой (показаны значения BS/PP). Приведены хромосомные числа (2n); в скобках показаны гипотетические предковые числа хромосом и их вероятные изменения по данным реконструкции на основе байесовского анализа. Сокращения: В. — *Batrachuperus*; P. — *Paradactylodon*; L. — *Liua*; H. — *Hynobius*.

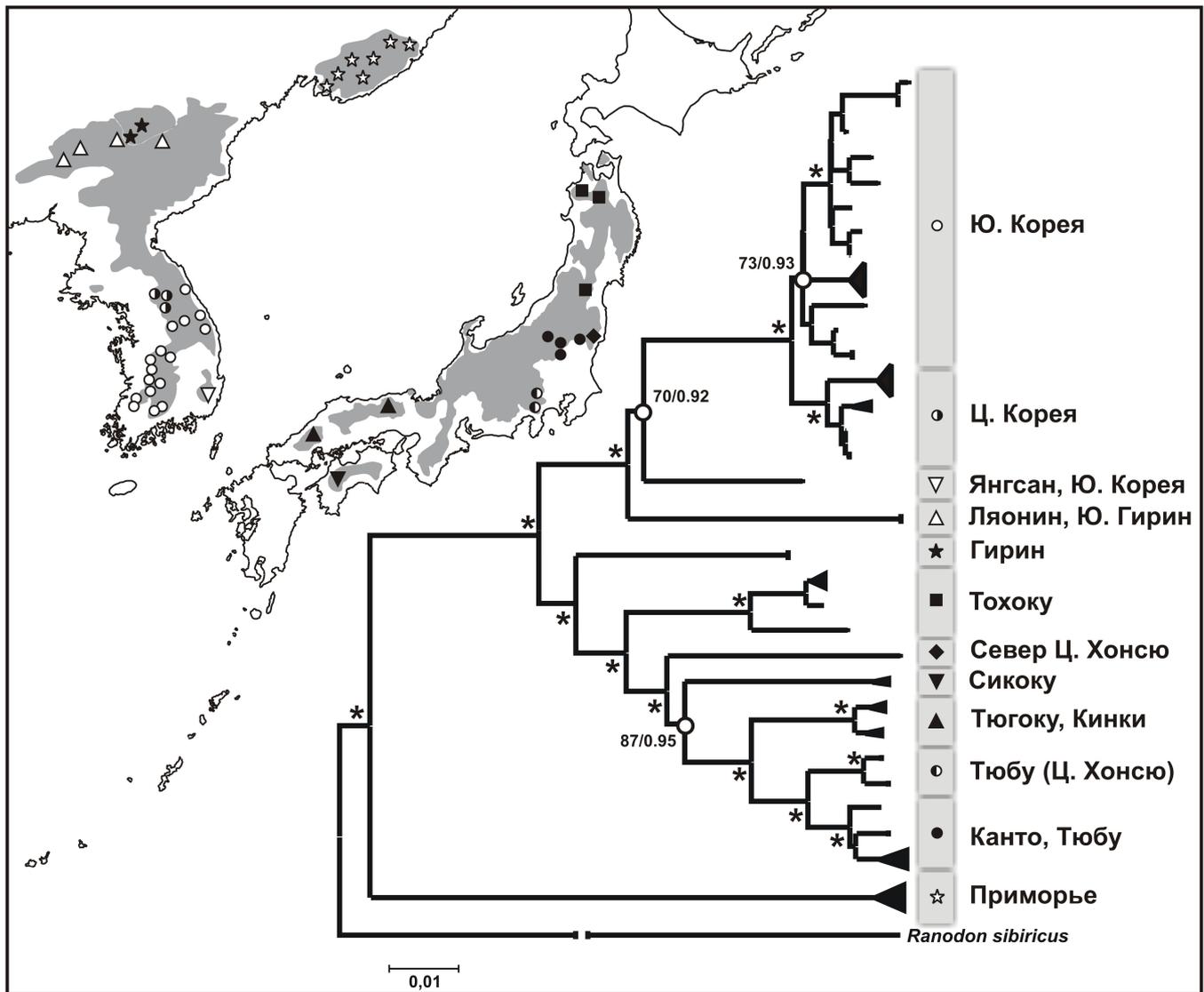
Полученная на основе анализа последовательностей трёх ядерных генов RAG1, BDNF и POMC филогенетическая гипотеза достаточно стабильна и в большинстве узлов хорошо разрешена; топология схем, полученных разными алгоритмами (MP, UML и PBA), оказалась идентичной (рис. 2). Филогенетические гипотезы, основанные на анализе мтДНК и яДНК, отличаются, эти различия устойчивы и касаются нескольких достоверно поддержанных узлов. И мтДНК-, и яДНК-схемы согласуются в определении филогенетического положения рода *Onychodactylus* и рассматривают его как наиболее обособленную группу. Основные топологические отличия заключаются в том, что, согласно данным яДНК, наиболее базальное положение в группе Hynobiidae s. str. занимает клада западноазиатских углозубых (*Ranodon* и *Paradactylodon*), а не род *Pachyhynobius*, как это вытекает из анализа мтДНК. При этом следующим после клады *Ranodon* — *Paradactylodon* от общего ствола Hynobiidae s. str. отделяется род *Salamandrella*, и лишь потом - род *Pachyhynobius*, который является группой, сестринской к кладе, объединяющей западнокитайских углозубов и род *Hynobius*. Поддержка такой топологии не абсолютная, но в целом достоверная. Ранее род *Salamandrella* сближался с *Hynobius* (Fei, Ye, 1984; Zhao, Hu, 1984; 1988) или западнокитайскими углозубыми (Zhang *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2010). Последнее различие в топологии яДНК- и мтДНК-дендрограмм касается положения клады, объединяющей тайваньских представителей рода *Hynobius*. Согласно результатам анализа яДНК, эта группа рассматривается как наиболее базальная линия рода *Hynobius* (BS=82%; PP=0.99). При этом, согласно анализу мтДНК, наиболее базальное положение занимает *H. (Satobius) retardatus* с Хоккайдо. Таким образом, мы столкнулись с существенными противоречиями между результатами филогенетического анализа яДНК и мтДНК. Определенными основаниями предпочесть одну филогенетическую схему другой мы не располагаем. Несмотря на большое сходство между полученными топологиями, 3 узла в них разрешены альтернативным образом. Причины подобного рода топологических противоречий не ясны. По-видимому, они касаются преимущественно давних кладогенетических событий (старше 50 млн. лет), когда разрешающая способность обоих маркеров падает ввиду различных причин. Вероятно, эти кладогенетические события произошли в относительно короткие с эволюционной точки зрения промежутки времени. Такие различия между основанными на мтДНК и яДНК гипотезами встречаются в ряде работ по филогенетике амфибий (Zhang, Wake, 2009; Vieites *et al.*, 2009).

**III.4. Общая филогенетическая структура семейства Hynobiidae.** Полученные на основе анализа мтДНК- и яДНК-маркеров филогенетические схемы позволяют лучше понять эволюционные связи представителей семейства Hynobiidae. Несмотря на некоторые топологические противоречия между ними, в целом они хорошо согласуются друг с другом (рис. 2). Монофилия семейства Hynobiidae ранее оспаривалась в ряде работ по эволюционной морфологии (Trueb, 1993; Trueb, Cloutier, 1991; Boisvert, 2009). Однако как мтДНК-, так и яДНК-маркеры свидетельствуют в пользу монофилии семейства. Наиболее обособленным является род *Onychodactylus*, представляющий собой, по-видимому, давно отделившуюся и высокоспециализированную линию углозубых, дифференциация которой соответствует уровню подсемейства – семейства хвостатых амфибий; таксономическое разнообразие этого рода также значительно недооценено (см. раздел III.6). **Группа настоящих углозубых (Hynobiidae s. str.)** объединяет все роды Hynobiidae, кроме *Onychodactylus*, и достоверно монофилетична. Положение монотипического рода *Pachyhynobius* разрешено неоднозначно — он рассматривается как наиболее базальная линия группы Hynobiidae s. str. по данным мтДНК или как сестринская группа по отношению к кладе, объединяющей западнокитайских углозубов и род *Hynobius* по данным яДНК. *Pachyhynobius* характеризуется значительной морфологической обособленностью от остальных Hynobiidae s. str., в его пределах выявлены две мтДНК-линии, дифференциация которых, по-видимому, не достигает видового уровня. **Группа западноазиатских углозубых** объединяет два рода углозубых из Среднего Востока и Средней Азии: *Paradactylodon* и *Ranodon*. Положение этой группы разрешено неоднозначно, по данным яДНК она рассматривается как наиболее базальная линия в кладе Hynobiidae s. str. Род *Paradactylodon* достоверно монофилетичен, *P. mustersi* из Афганистана значительно отличается от иранских видов, как по данным мтДНК и яДНК, так и по особенностям внешней морфологии, различия приближаются к уровню родовых. Иранские виды *P. gorganensis* и *P. persicus* генетически крайне близки ( $p=0.033$ ). Дифференциация в пределах монотипического рода *Ranodon* также очень мала ( $p<0.015$ ). **Группа восточноазиатских углозубых** объединяет самый крупный род семейства — *Hynobius*, четыре рода западнокитайских углозубых (*Batrachuperus*, *Liua*, *Pseudohynobius* и *Protohynobius*) и, по-видимому, род *Salamandrella*. Положение последнего рода достаточно нестабильно, по данным яДНК он рассматривается как наиболее базальная линия среди восточноазиатских углозубых. **Группа западнокитайских углозубых** объединяет четыре рода углозубых из восточной части Тибетского плато. Согласно анализу аминокислотных последовательностей мтДНК, группа представлена двумя монофилетическими кладами, первая объединяет роды *Pseudohynobius* и *Protohynobius*, а вторая — постоянноводные роды *Batrachuperus* и *Liua*. Поддержка объединения *Batrachuperus* и *Liua* по данным анализа яДНК недостоверна. В составе рода *Batrachuperus* выявлено около 4–5 криптических видов. Морфологическая и генетическая дифференциация рода *Liua* значительна и, вероятно, достигает уровня подродовых; в составе *L. shihi* и *L. tsinpaensis* также обнаружены мтДНК-линии неясного статуса. Род *Hynobius* самый большой в семействе и насчитывает сегодня более 33 видов. Монофилия *Hynobius* подтверждается данными анализа как мтДНК-, так и яДНК-маркеров. В составе *Hynobius* наиболее обособленные положения занимают монотипическая группа *Satobius* и группа тайваньских углозубов, которые имеет смысл рассматривать как подроды. Остальные виды группируются в подрод *Pachypalaminus*, объединяющий комплексы *H. boulengeri* и *H. kimurae*, и подрод *Hynobius s. str.*, объединяющий прочие видовые комплексы. Современная система рода недооценивает действительное разнообразие: молекулярный анализ выявил наличие, по крайней мере, еще 8 криптических форм.

**III.5. Кариологическая изменчивость углозубов (Hynobiidae): число хромосом и размер генома.** Обобщение данных по числу и морфологии хромосом Hynobiidae важно для понимания эволюции кариотипа этой группы и филогенетических связей между ее представителями. Максимальное количество хромосом наблюдается у наиболее базальной группы семейства — рода *Onychodactylus* ( $2n=78$ ), чей геном также отличается максимальным набором микрохромосом (38); гаплоидный набор хромосом *Onychodactylus* ( $n=39$ ) является самым большим из известных для земноводных. Крупные кариотипы отмечены у родов *Ranodon*, *Liua* и *Batrachuperus pinchonii* ( $2n=66$ ). При этом у других форм наблюдается уменьшение числа

хромосом, преимущественно за счет исчезновения микрохромосом: *Pachyhynobius* ( $2n=64$ ), *Paradactylodon* ( $2n=62$ ), *Salamandrella* ( $2n=62$ ). В пределах рода *Batrachuperus* наблюдается хромосомная изменчивость, и вид *B. tibetanus* имеет  $2n=62$ , а остальные формы, вероятно,  $2n=66$ . Надрод *Hynobius* и комплекс *Pseudohynobius* — *Protohynobius* имеют значительно меньшее, чем другие углозубые, число хромосом. *Pseudohynobius* и *Protohynobius* обладают сходными кариотипами и  $2n=52$ . Надрод *Hynobius* отличается уникальным хромосомным полиморфизмом. Так называемые «прудовые» группы видов *Hynobius* характеризуются меньшим количеством хромосом (подрод *Hynobius*,  $2n=56$ ) по сравнению с «ручьевыми» (подрод *Pachypalaminus*, группа «*Pseudosalamandra*»,  $2n=58$ ). Все исследованные тайваньские виды имеют  $2n=58$ . Крайняя для *Hynobiidae* степень редукции числа хромосом наблюдается у *H. (Satobius) retardatus* с  $2n=40$ , что связано с редукцией большей части микрохромосом, которых остается 6 пар. Минимальные значения числа плеч хромосом (NF) наблюдаются у *H. (Satobius) retardatus* (NF=72), максимальные — у представителей родов *Onychodactylus* и *Hynobius* (*H. boulengeri*, *H. kimurae*) (NF=102). У большинства видов углозубых значения NF варьируют в пределах 80–90. Нами были определены кариотипы 13 видов, из них для 5 видов — впервые: *Salamandrella tridactyla* ( $2n=62$ ; NF=92), *Hynobius fuca* ( $2n=58$ ; NF=98), *H. sp. 1* ( $2n=58$ ; NF=94), *H. guabangshanensis* ( $2n=56$ ; NF=92), *H. maershanensis* ( $2n=56$ ; NF=92).

Изменчивость размера генома на гаплоидное ядро (C-value) у хвостатых земноводных превышает изменчивость в других группах позвоночных. Она связана прежде всего с различиями в размерах хромосом, а не в их числе, и, вероятно, является отражением не только филогенетического положения, но даже в большей степени комплексных различий в биологии развития, морфогенезе и экологии сравниваемых форм (Sessions, 1984; Sessions, Larson, 1987; Gregory, 2005; Litvinchuk *et al.*, 2004; 2007; Sessions *et al.*, 2008). Ранее размер генома ряда форм *Hynobiidae* был изучен с помощью денситометрии по Фельгену (Мазин, 1978; Morescalchi *et al.*, 1979; Графодатский, Григорьев, 1982) и проточной цитометрии (Vinogradov, 1998; Stöck, 1999; Litvinchuk *et al.*, 2004), однако ввиду высокой ошибки измерений первого метода эти данные несопоставимы. С помощью проточной цитометрии мы исследовали размер генома 19 видов из 6 родов *Hynobiidae*, для 14 видов данные были получены впервые. Согласно нашим данным, размер генома различных представителей *Hynobiidae* колеблется от 45.4 до 110.11 пг. Наименьший из отмеченных нами размеров генома наблюдался у *Hynobius quepaertensis* ( $46.3 \pm 0.6$  пг), а максимальный у *Onychodactylus fischeri* ( $109.1 \pm 0.9$  пг). Различия между нашими оценками размера генома *Onychodactylus fischeri*, *Salamandrella keyserlingii*, *Salamandrella tridactyla* и *Ranodon sibiricus*, и данными предыдущих исследователей (Litvinchuk *et al.*, 2004), незначительны. Наша оценка размера генома *Paradactylodon gorganensis* ( $48.0 \pm 0.6$  пг) существенно отличается от опубликованной ранее (34.77 пг; Stöck, 1999), что, вероятно, связано с использованием различных реперных видов. Наши исследования подтверждают показанные ранее (Morescalchi *et al.*, 1979; Litvinchuk *et al.*, 2004) значительные отличия рода *Onychodactylus* по размеру генома (106.2–110.1 пг) от остальных углозубых (размер генома варьирует в пределах 45.4–68.1 пг). Это согласуется с обособленным филогенетическим положением *Onychodactylus*. В группе *Hynobiidae* s. str. корреляции между числом хромосом, филогенетическим положением и размером генома не выявлены. В пределах рода *Hynobius* «прудовые» формы *Hynobius* s. str. и *Satobius* имели меньшие значения размера генома (45.4–54.2 пг), чем «ручьевые» *Pachypalaminus* и тайваньские виды *Hynobius* (60.8–67.0 пг). Сходные значения размера генома демонстрировали и другие ручьевые формы родов *Batrachuperus* (60.2–63.1 пг) и *Pachyhynobius* (60.94 пг $\pm$ 0.7 пг), что, возможно, связано со сходной биологией размножения и продолжительным эмбриональным развитием у ручьевых форм углозубов. С другой стороны, базальные «ручьевые» роды *Ranodon* и *Paradactylodon* имели меньшие размеры генома (*R. sibiricus*: 55.1–57.1 пг; *P. gorganensis*: 47.3–48.5 пг), в то время как размножающийся в стоячих водоемах род *Salamandrella*, напротив, имел большие размеры генома (63.8–66.9 пг); таким образом, говорить о четких закономерностях затруднительно. В пределах группы тайваньских *Hynobius* выявлены достоверные относительные различия по размеру между отдельными популяциями *H. arisanensis* (RD=1.6%) и *H. formosanus* (RD=1.1%), их таксономическое значение не ясно. При этом *H. sonani* и *H. arisanensis* оказались неотличимыми по размеру генома, что согласуется с филогенетической близостью этих видов.



**Рис. 3.** Филогенетические связи представителей рода *Onychodactylus* по данным анализа фрагментов *cyt b*, *16S rRNA* и *COI* (2345 п.о. мтДНК). Звездочкой (\*) обозначены узлы с максимальной статистической поддержкой ( $BS > 97\%$ ,  $PP > 0.97$ ); кружком обозначены узлы с умеренной поддержкой (показаны значения  $BS/PP$ ).

**III.6. Внутри- и межвидовая дифференциация и систематика безлегочных тритонов (*Onychodactylus*).** Филогенетический анализ показал базальное положение рода *Onychodactylus* в системе *Nymphobiidae*. Сегодня признается два вида этого рода — *O. japonicus* с Хонсю и Сикоку и *O. fischeri* из Кореи, провинций Ляонин и Гирин КНР и юга Приморья РФ. Недавно появились данные о глубокой молекулярной дифференциации *O. japonicus* (Yoshikawa *et al.*, 2008). Мы исследовали фрагменты мтДНК генов *16S rRNA*, *cyt b* и *COI* у 220 представителей *Onychodactylus* из 49 популяций со всего ареала рода, кроме территории КНДР, а также морфологическую дифференциацию рода по 223 взрослым экземплярам. Исследования показали неожиданно высокое генетическое разнообразие рода, в общей сложности было выявлено не менее 8 линий, *p*-дистанция между которыми по *COI* превышает 0.05 (рис. 3). Для 6 линий обособленность была подтверждена секвенированием ядерных генов ( $0.004 \leq p \leq 0.007$ ). Статистический анализ по 14 метрическим, 3 меристическим признакам, а также 23 качественным признакам окраски позволил различить особей из Сихотэ-Алиня (РФ), пров. Гирин (КНР), южной Кореи, северной и центральной частей о-ва Хонсю (Япония). Эти данные позволяют нам рассматривать выявленные формы как потенциальные виды, таксономический статус которых нуждается в проверке. Виды рода *Onychodactylus* достаточно надежно различаются по числу костальных бороздок и туловищных позвонков, а также по числу сошниковых зубов, форме их рядов, по пропорциям туловища и хвоста и особенностям окраски. Начало дифференциации рода *Onychodactylus* по данным яДНК оценивается в 18 млн. лет (обособление *O. fischeri* s. str.).

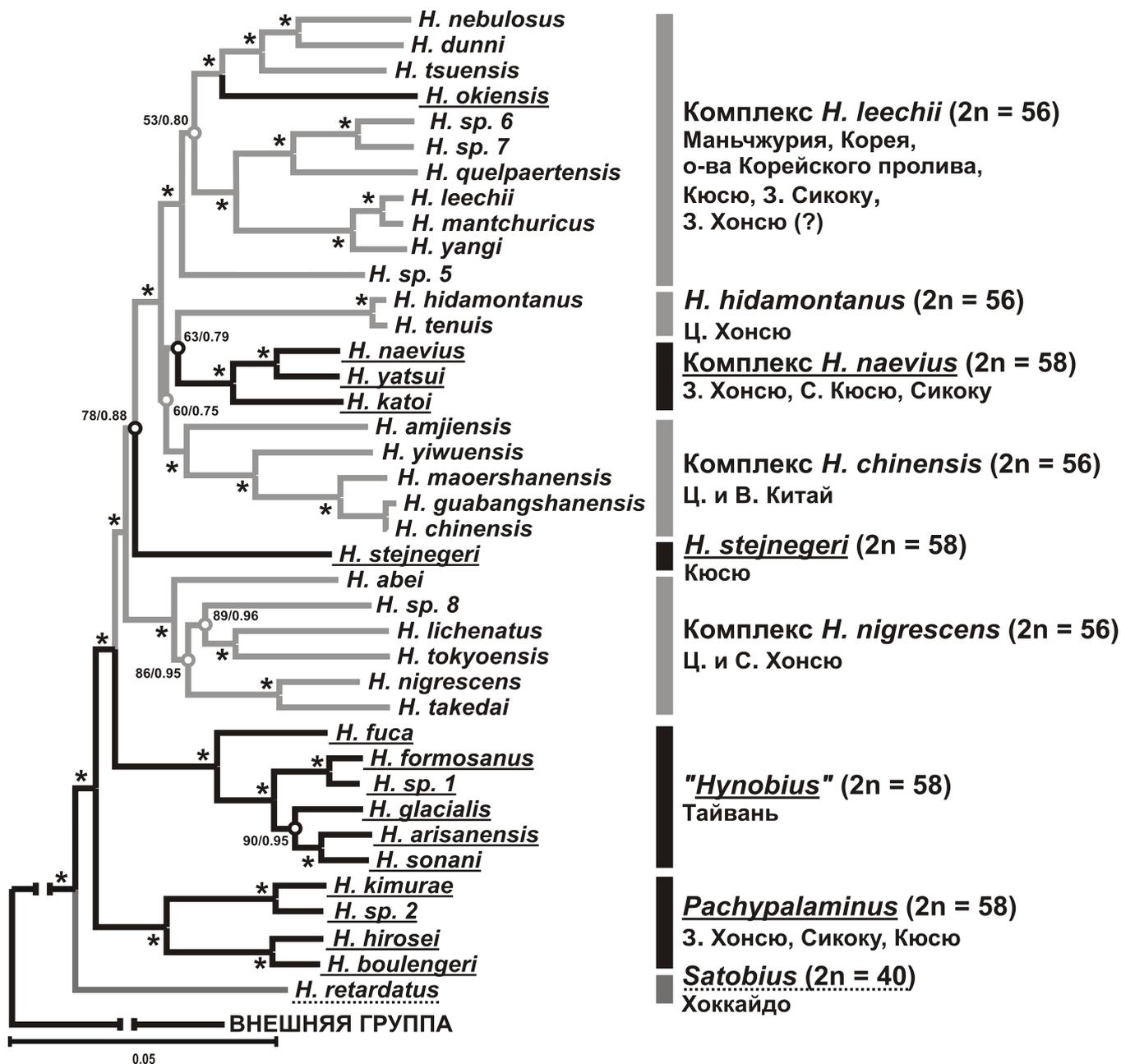
Наиболее базальное положение занимает значительно обособленная ( $p = 0.112\sim 0.133$ ) форма *O. fischeri* s. str., населяющая, по-видимому, только южные отроги Сихотэ-Алиня на территории РФ. Все остальные виды образуют надежную монофилетическую кладу, дифференциация линий в пределах которой колеблется от 0.05 до 0.093 ( $p$ ). Она делится на две субклады, первая из которых объединяет популяции Корейского полуострова, а также линию из пров. Ляонин и юга пров. Гири (КНР). Неожиданным оказалось положение популяции г. Янгсан на юго-востоке Кореи, которая заметно отличается от других корейских и китайских популяций ( $0.06 \leq p \leq 0.075$ ). Вторая субклада объединяет все популяции Японского архипелага, образующие монофилию, и, что также оказалось неожиданным, линию, населяющую горную часть пров. Гири (КНР); причем обособленность этой популяции весьма значительна ( $0.075 \leq p \leq 0.091$ ). На территории Японии выявлено не менее 7 обособленных линий, в целом в соответствии с данными Ёсикава с соавт. (Yoshikawa *et al.*, 2008). Для двух из этих линий недавно было показано наличие репродуктивной изоляции в зоне симпатрии (Yoshikawa *et al.*, 2010), что подтверждает выдвинутое нами предположение о видовом статусе выявленных форм. Выявленная структура рода *Onychodactylus* показывает не только несоответствие современной таксономии группы действительному разнообразию, но и свидетельствует о сложной эволюционной истории рода. Предложен палеогеографический сценарий, описывающий возможные пути эволюции рода.

**III.7. Молекулярная дифференциация, систематика и филогеография надвидового комплекса сибирского углозуба (*Salamandrella*).** Сибирский углозуб (*Salamandrella keyserlingii*) имеет один из наиболее обширных ареалов среди современных амфибий. Недавно было показано наличие криптического вида на Дальнем Востоке РФ, ряд авторов применяют для него название *S. schrenckii* (Берман, 2005; Matsui *et al.*, 2008; Малярчук *и др.*, 2009), другие обозначают его как *S. tridactyla* (Кузьмин, 2008; Frost, 2010). До последнего времени распространение и таксономический статус выявленной криптической формы оставался до конца не определенным. Мы исследовали фрагменты мтДНК генов *cyt b* и *COI* у 439 особей рода *Salamandrella* из, в общей сложности, 74 локалитетов, причем в анализ были включены 19 популяций из Китая, 2 из Японии и 4 из Сахалинской области, что обеспечило более полное покрытие ареала рода. Анализ мтДНК показал значительную дивергенцию между двумя криптическими формами ( $0.94 \leq p \leq 0.11$ ), а анализ яДНК-маркеров подтвердил их видовой статус, что согласуется с результатами аллозимного анализа (Matsui *et al.*, 2008). Время дивергенции двух видов *Salamandrella* по данным яДНК оценивается в 7.0 млн. лет.

Согласно результатам анализа мтДНК, *S. keyserlingii* был обнаружен на всей территории ареала рода в Европе и Сибири, на юг вплоть до Малого Хингана на территории пров. Хэйлуцзян КНР, а также на островах Тихого океана, в то время как дальневосточный вид *S. tridactyla* / *S. schrenckii* был выявлен на территории Приморья и Хабаровского края по долине р. Уссури, а также на территории пров. Гири и Хэйлуцзян (КНР) и равнинной части Еврейской АО. Вероятной географической границей, разделяющей два вида на территории КНР, является, по-видимому, р. Сунгари (Сунхуацзян). Т.о., оба вида *Salamandrella* встречаются на территории Китая, а дальневосточный вид населяет также север КНДР. Находка изолированной популяции *S. tridactyla* / *S. schrenckii* на территории Еврейской АО на правом берегу Амура, окруженной популяциями *S. keyserlingii*, по-видимому, отражает изменения русла рек или расселение углозубов во время половодий, эта территория перспективна для изучения репродуктивной изоляции между двумя видами. В пределах каждого из видов *Salamandrella* была выявлена филогеографическая структура, дальневосточный вид по сравнению с сибирским отличается заметно большими значениями нуклеотидного и гаплотипического разнообразия. В составе *S. tridactyla* / *S. schrenckii* было обнаружено три значительно обособленные монофилетические линии гаплотипов (BS=95~100%;  $0.028 \leq p \leq 0.041$ ), две из которых соответствуют группам, выделенным Малярчуком с соавт. (2009), и встречаются в верхнем и нижнем течении р. Уссури, а также, согласно нашим данным, на территории Маньчжурии. Третья наиболее обособленная линия встречается изолированно в горной части пров. Гири КНР. В составе *S. keyserlingii* мтДНК гаплотипы группируются в три обособленные монофилетические клады (BS=95~100%;  $0.016 \leq p \leq 0.031$ ), из которых наиболее базальное положение занимает линия, встречающаяся на

Хоккайдо и Кунашире. Вероятно, к этой кладе относятся и некоторые популяции Хабаровского края и Сахалина (Malyarchuk *et al.*, 2010). Неожиданным оказалось обособление локальной линии *S. keyserlingii* из предгорий Малого Хингана, пров. Хэйлунцзян, КНР. Большую часть ареала вида занимает одна линия гаплотипов. Полученные данные свидетельствуют о более высоком, чем предполагалось ранее, генетическом разнообразии обоих видов *Salamandrella* на территории Маньчжурии, которая и рассматривается нами как предположительная область формирования группы. Демографический анализ показал значительную стабильность эволюционной истории 2х из 3х линий *S. tridactyla* / *S. schrenckii*. Сахалин, по-видимому, неоднократно колонизировался *S. keyserlingii*, а обособленная популяция Хоккайдо и южных Курил отражает первую волну расселения вида. Большая часть ареала *S. keyserlingii* была заселена одной линией в течение последних 0.05–0.1 млн. лет (вероятно, между ледниковыми максимумами 90 и 60 тыс. лет назад) и генетически крайне однородна (Поярков, Кузьмин, 2008).

**III.8. Молекулярная, морфологическая и кариологическая дифференциация и систематика углозубов рода *Hynobius*.** Филогенетические связи между видами *Hynobius* — самого большого рода семейства — остаются ключевой проблемой систематики Hynobiidae. Сегодня насчитывают около 33 видов *Hynobius*, однако таксономический статус многих форм нуждается в проверке. Мы провели филогенетический анализ 42 линий по фрагментам мтДНК (общее выравнивание до 4850 п.о.), для 23 из них были получены последовательности 3х ядерных генов (2715 п.о.). Как мтДНК-, так и яДНК-схемы однозначно подтверждают монофилию *Hynobius* s. lato. Основные топологические отличия между ними заключаются в положении *H. (Satobius) retardatus* — в первом случае этот вид рассматривается как самая базальная линия рода, в то время как согласно данным яДНК, базальное положение занимает группа тайваньских *Hynobius*. Однако, вопреки аллозимным данным (Matsui *et al.*, 1992), обособленность *Satobius* весьма значительна, что позволяет рассматривать его как отдельный подрод. Филогенетические отношения *Hynobius* по данным мтДНК (рис. 4) предполагают полифилию группы ручьевых углозубов (ранее входивших в состав рода *Pseudosalamandra*). Несмотря на значительное сходство в морфологии и биологии этих форм, они распадаются на пять отдельных линий, — одна на Тайване и четыре в Японии. Филогенетическая и морфологическая обособленность тайваньских углозубов значительна и соответствует уровню подрода *Hynobius*. Японские углозубы, ранее рассматриваемые в составе рода *Pachypalaminus* (*H. boulengeri*, *H. Hirosei*), образуют достоверно монофилетическую кладу с комплексом *H. kimurae* (ранее сближавшемся с *H. naevius*). Эта кладка образует одну из базальных линий рода *Hynobius*, обладает рядом черт морфологического сходства и может рассматриваться как самостоятельный подрод. Остальные виды рода формируют монофилетическую группу, которая объединяет как ручьевые, так и прудовые формы углозубов из Китая, Кореи и Японии и может рассматриваться как подрод *Hynobius* s. str. «Ручьевая» группа *H. naevius* распадается на две линии, — собственно комплекс видов *H. naevius*, близкий японским «прудовым» углозубам, и *H. stejnegeri*, филогенетическое положение которого неопределенно и противоречит имеющимся аллозимным данным (Nishikawa *et al.*, 2001, 2003, 2005, 2007, 2008). То, что большинство базальных линий рода *Hynobius* является ручьевыми формами, заставляет нас предположить, что это состояние было свойственно и общим предкам рода. Интересно положение *H. okiensis* (формы, ранее считавшейся членом комплекса *H. naevius*): этот ручьевой вид оказался членом группы типичных «прудовых» видов комплекса *H. nebulosus*, что подтверждается также хромосомным и аллозимным анализами (Seto *et al.*, 1987; Matsui *et al.*, 2007) и отражает, по-видимому, вторичную адаптацию к ручьевому образу жизни. Углозубы «прудового» типа формируют три монофилетических комплекса видов. Комплекс *H. nigrescens* объединяет виды с севера и из центра Хонсю, а также *H. abei* и популяции с Хонсю, ранее относимые к *H. nebulosus* (вероятно, они соответствуют *H. peropus*). Виды из центрального и восточного Китая образуют монофилетический комплекс *H. chinensis*. Он близок к видовым комплексам *H. leechii* и *H. nebulosus*, которые населяют южную Маньчжурию, Корейский полуостров и острова Корейского пролива (Цусима, Чеджудо, Дого), Кюсю, запад Сикоку (и, вероятно, запад Хонсю) и включают не менее 11 форм, морфологическая и филогенетическая близость которых позволяет рассматривать их в составе одного видового комплекса.



**Рис. 4.** Филогенетические связи представителей рода *Нупобиус* по данным анализа фрагментов мтДНК (до 4580 п.о.). Звездочкой (\*) обозначены узлы с максимальной статистической поддержкой ( $BS > 97\%$ ,  $PP > 0.97$ ); кружком обозначены узлы с умеренной поддержкой (показаны значения  $BS/PP$ ). Чёрным и подчеркиванием выделены виды «ручьевого» типа углозубов, серым без подчеркивания – «прудовые» *Нупобиус*, а пунктирной линией – *Satobius*.

Таким образом, род *Нупобиус* монофилетичен, в связи с чем, в связи со значительной дифференциацией и разнообразием, имеет смысл рассматривать его как надрод. Базальная дифференциация рода началась, по-видимому, около 31–36 млн. лет назад. Наше исследование показало, что систематика рода *Нупобиус* недостаточно разработана в отношении как филогении, так и видового разнообразия группы. Особенный интерес вызывает филогенетическое положение и межвидовая дифференциация *Нупобиус* Тайваня, представляющих собой одну из наиболее обособленных линий рода. На Тайване, где недавно признавался 1 вид углозубов, сегодня насчитывают 5 узкоареальных алло- или парapatрически распространенных видов (Lai, Lue, 2008), а наши находки позволяют предполагать наличие еще 1-2 неописанных таксонов. Среди «прудовых» углозубов корейского полуострова комплекса *H. leechii* выявлено по меньшей мере 3 самостоятельных линии, одна из которых (*H. sp. 5*) филогенетически значительно обособлена и является сестринской группой к объединению комплексов *H. leechii* из Кореи и *H. nebulosus* из Японии (рис. 4). Все это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований филогении и систематики углозубов рода *Нупобиус*.

## ГЛАВА IV. СИСТЕМАТИКА И ПУТИ ЭВОЛЮЦИИ СЕМЕЙСТВА HYNوبيИДАЕ

**IV.1. Эволюция морфологических и кариологических признаков в семействе Hynوبيidae.** Основные диагностические признаки, важные для родовой систематики углозубых, скоррелированы с экологией рассматриваемых форм. В целом, можно выделить несколько морфо-экологических типов углозубых, представители которых связаны сходным образом жизни и биологией размножения. Ранее считалось, что примитивными формами углозубых следует считать наименее специализированных представителей, напоминающих углозубов рода *Hynوبيus*, например, *H. leechii* (Dunn, 1923). Однако филогенетические данные предполагают базальное положение *Onychodactylus*, — крайне специализированной реофильной формы. Степень морфологической обособленности *Onychodactylus* весьма значительна, ряд признаков отличают его от всех остальных Caudata. Для этого рода характерна значительная степень эмбрионизации (Smirnov, Vassilieva, 2002). Реофильность, по-видимому, тесно связана с уменьшением размера кладки, увеличением размера икринок и продолжительности эмбрионального развития. Помимо *Onychodactylus*, уникальные адаптации к размножению в ручьях демонстрируют тайваньские виды *Hynوبيus*, отличающиеся значительной редукцией личиночной стадии без фазы активного питания и, в крайнем случае, откладывающие икру во влажную почву. Для форм, ведущих постоянно-водный образ жизни, характерно увеличение размеров, наличие пedomорфных черт в организации скелета, тяготение к неотении и формирование ряда адаптаций, полезных при длительном развитии и жизни в условиях проточных водоемов. Ярким примером этой тенденции является морфологическое сходство неблизкородственных *Paradactylodon* и *Batrachuperus*, долгое время относимых к одному роду. Наземный образ жизни, напротив, связан, как правило, с уменьшением размера и ускорением личиночного развития. Интересно филогенетическое положение рода *Salamandrella*, — типично наземной формы «прудового» типа, длительное время рассматривавшегося в составе рода *Hynوبيus* в связи со значительным морфологическим сходством. Согласно нашим данным, *Salamandrella* является одной из базальных линий Hynوبيidae s. str., неродственной *Hynوبيus*. Исходя из данных филогенетического анализа, очевидно, что в ходе эволюционной истории углозубых происходили неоднократные изменения морфо-экологических типов, приведшие к параллельному приобретению сходных сочетаний признаков. Наиболее распространён тип околородных форм, который встречается почти во всех основных филогенетических линиях семейства. По-видимому, такие малоспециализированные горные формы (наподобие *Ranodon*) представляют собой исходную для Hynوبيidae нишу, — из этого типа можно вывести как постоянноводные пedomорфные формы, так и более специализированные наземные. Это предположение согласуется с тем, что к этому типу относятся наиболее базальные формы семейства.

Принято считать (Morescalchi, 1973, 1975; Sessions, 2008), что для амфибий плезиоморфным состоянием кариотипа является асимметричный бимодальный кариотип с большим числом хромосом и микрохромосом, а последующие эволюционные изменения связаны с независимым постепенным сокращением числа хромосом, уменьшением числа телоцентрических хромосом и выравниванием кариотипов. Семейство Hynوبيidae хорошо иллюстрирует эту закономерность. Кариотип наиболее базального рода *Onychodactylus* является, возможно, самым примитивным для амфибий, демонстрируя максимальное гаплоидное число хромосом ( $n=39$ ), наибольшее число микрохромосом (38) и большое количество тело- и субтелоцентрических хромосом. Другие базальные линии углозубых сохраняют плезиоморфное состояние генома и хромосомные наборы с большим количеством тело- и субтелоцентрических хромосом. Согласно результатам реконструкции (Sessions, 2008), возможное число хромосом общего предка Cruptobranchidae ( $2n=60$ ) и Hynوبيidae ( $2n=40\sim78$ ) определяется как  $2n=66$ . Этот результат основан на гипотезе, что уменьшение числа хромосом в эволюции кариотипа более вероятно, чем увеличение; но нельзя исключать и независимого уменьшения хромосомных чисел у Cruptobranchidae и Hynوبيidae s. str. Реконструкция эволюции числа хромосом у Hynوبيidae по данным байесовского анализа филогенетических данных предполагает следующую схему (рис. 2). Примитивные кариотипы ( $2n=66$ ) характерны для представителей родов *Ranodon*, *Liua* и большинства видов *Batrachuperus*; это число хромосом, вероятно, является предковым для

группы *Hynobiidae* s. str. При этом у других базальных форм *Hynobiidae* s. str. наблюдается независимое уменьшение предкового числа хромосом, преимущественно за счет исчезновения микрохромосом до  $2n=64$  (*Pachyhynobius*) и  $2n=62$  (*Paradactylodon*, *Salamandrella*, *B. tibetanus*). Для *B. yenyuanensis* есть неподтвержденные данные о большем числе хромосом ( $2n=68$ ) (Yang et al., 1990). Роды *Pachyhynobius* и *Salamandrella* отличаются большим количеством телоцентрических хромосом, что соответствует плезиоморфному состоянию кариотипа. Значительное уменьшение числа хромосом параллельно и независимо происходит у предков *Pseudohynobius* — *Protohynobius* (до  $2n=52$ ) и у предков надрода *Hynobius*. Предок *Hynobius* имел, вероятно,  $2n=58$ , а в ряде линий произошло независимое изменение числа хромосом до  $2n=56$  у «прудовых» углозубов и до  $2n=40$  у *H. (Satobius) retardatus*. Филогенетические данные свидетельствуют о полифилии «ручьевых» ( $2n=58$ ) и парафилии «прудовых» углозубов ( $2n=56$ ) (рис. 4); т.о. хромосомные числа связаны с морфо-экологическими типами, а не с филогруппами углозубов. Вероятно, число хромосом неоднократно изменялось в ходе эволюции рода *Hynobius*.

Итак, мы можем предположить, что в эволюции семейства *Hynobiidae* неоднократно происходили множественные параллельные изменения как морфологических, так и кариологических признаков, что ставит вопрос о причинах подобного распределения гомоплазий. Этот вопрос крайне интересен и требует дополнительных исследований.

#### IV.2. Особенности распространения и зоогеографии основных групп *Hynobiidae*.

*Hynobiidae* — семейство амфибий, характерное для Палеарктики. Самые южные находки углозубых известны с о-ва Тайвань ( $22.75^\circ$  с.ш.). Все находки углозубов в самой южной части их ареала привязаны к высокогорным районам (более 2000 м), которые и флористически, и фаунистически ближе к Палеарктике, однако нельзя исключать вероятность обнаружения новых форм в горных районах южной Азии. Южная граница Палеарктики в Азии является предметом интенсивных научных дискуссий (Тахтаджян, 1978; Щербак, 1982; Borkin, 1999; Zhao, 1999); ввиду взаимного проникновения фаун четкой границы провести не удаётся. Мы рассматриваем *Hynobiidae* как автохтонные палеарктические элементы, свойственные западно-азиатской, центрально-азиатской, сибирской и восточноазиатской подобластям палеарктической области. Для *Hynobiidae* характерен фрагментированный ареал, состоящий из ряда изолированных участков, связанных преимущественно с горными районами. Наиболее значительная дизъюнкция разделяет западноазиатские роды *Paradactylodon* и *Ranodon* и роды углозубов западного Китая (аридные районы и высокогорья Центральной Азии). Линии *Paradactylodon* и *Ranodon* также географически разобщены — небольшие ареалы *Ranodon sibiricus*, *Paradactylodon mustersi* и комплекса *P. persicus* отстоят на примерно равное расстояние друг от друга. Другая дизъюнкция разделяет фауну *Hynobiidae* центрального и восточного Китая и углозубых, населяющих северо-восточную Азию (аридный пояс центрального Китая). Граница между ареалами углозубых восточного и западного Китая проходит по восточным отрогам хр. Дабашань и Далоушань: низкогорные участки на востоке населяют *Hynobius* и *Pachyhynobius*, а высокогорья на западе — группа западнокитайских углозубов. Долина р. Янцзы рассматривается как южная граница Палеарктики (Zhao, Adler, 1993); в центральном Китае роды *Hynobius* и *Pseudohynobius* встречаются к югу, а роды *Batrachuperus*, *Liua*, *Protohynobius* и *Pachyhynobius* — к северу от ее русла. Род *Salamandrella* имеет самый обширный ареал из всех углозубых и встречается в восточно-европейской, сибирской и восточноазиатской областях Палеарктики. Род *Hynobius* имеет дизъюнктивный ареал и населяет горные районы центрального и восточного Китая, а также восточную Маньчжурию, Корейский полуостров и ряд островов Тихого океана. Географически и филогенетически наиболее обособлены формы с южной и северной границ ареала рода: углозубы о-ва Тайвань и эндемичный для Хоккайдо *H. (Satobius) retardatus*. Основное разнообразие форм рода *Hynobius* приходится на западные районы Японии (о-ва Кюсю, Сикоку и запад Хонсю). Род *Onychodactylus* встречается только в восточноазиатской области Палеарктики и обладает ареалом реликтового типа, привязанным к горным районам Хонсю, Сикоку, Корейского полуострова и юга Дальнего Востока РФ. Как на Японских островах, так и на континенте распространение рода *Onychodactylus* не является непрерывным. Существенной особенностью распространения родов *Hynobiidae* является то, что ареалы разных родов практически не перекрываются, а в немногих зонах контактов известны лишь единичные случаи

симпатрии представителей разных родов углозубых. Единственным исключением из этой закономерности является род *Onychodactylus* — он распространен симпатрично с видами *Hynobius* или *Salamandrella*. Из всех Hynobiidae род *Onychodactylus* является наиболее специализированной реофильной формой. По-видимому, эта специализация является достаточной для сосуществования его вместе с другими родами Hynobiidae.

#### **IV.3. Основные этапы и возможные пути эволюции семейства Hynobiidae.**

**Этапы дифференциации семейства.** Согласно данным оценки скорости накопления филогенетических линий («диверсификационный анализ» по Nee *et al.*, 1992; Harmon *et al.*, 2003), гипотеза о равномерном распределении кладогенетических событий в эволюционной истории Hynobiidae не подтверждается. Анализ показал наличие двух периодов радиации в эволюционной истории углозубых продолжительностью в целом не более десятой доли общей продолжительности эволюции группы. Первый из них приходится примерно на середину эволюционной истории семейства, а второй — на последнюю четверть. Мы предполагаем, что этапы радиации Hynobiidae могли быть связаны с наступлением благоприятных климатических и географических предпосылок, способствующих расселению и последующему обособлению различных линий углозубых. Определяющую роль биогеографических факторов в кладогенезе и радиации разных групп хвостатых амфибий, в том числе и углозубых, подчеркивали разные авторы (Weisrock, 2001, 2006; Kozak *et al.*, 2006; Vieites *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

**Молекулярные датировки.** Оценки молекулярных датировок времен дивергенций, сделанные по мтДНК и ядерным генам, хорошо коррелируют друг с другом и показывают в целом сходные значения. Это свидетельствует в пользу корректности выбранных нами методов молекулярных датировок и позволяет разработать единый палеогеографический сценарий для семейства. Ядерные датировки, как правило, дают не столь древние оценки кладогенетических событий; вероятно, оценки по яДНК несколько более точны. При оценке событий моложе 50 млн. лет разрешающая способность мтДНК постепенно уменьшается с возрастом события (как было показано Но *et al.*, 2005; Emerson, 2007), а таковая у яДНК остается примерно неизменной. При оценке филогенетических событий старше 50 млн. лет столь же четкой закономерности выявить не удастся, что, вероятно, связано с общим падением точности оценок. В пределах Hynobiidae скорости эволюции исследованных ядерных генов достоверно не отличались, в то время как скорость эволюции мтДНК была достоверно ниже у *Onychodactylus* и *Pachyhynobius*.

Дивергенция между *Cryptobranchidae* и Hynobiidae произошла в конце юры – начале мела и оценивается в 162/138 млн. лет (здесь и далее мтДНК/яДНК датировки). Начало дифференциации Hynobiidae и обособление *Onychodactylus* приходится на средний мел и оценивается примерно в 114/98 млн. лет. Вероятно, обособление предков *Onychodactylus* от основного ствола Hynobiidae происходило примерно в то же время и могло быть связано со сходными причинами, что и дифференциация основных семейств хвостатых амфибий. По данным анализа последовательностей яДНК, дифференциация группы Hynobiidae s. str. и формирование основных филогенетических линий произошли позже и завершились быстрее, чем по данным мтДНК (примерно с 65 по 46 млн. лет по данным мтДНК и с 56 по 44 млн. лет по яДНК). Согласно результатам молекулярных датировок, кладогенез в этой группе имеет два выраженных пика. Первый этап сводится к образованию групп родового ранга. Он приходится на палеоцен-эоцен и длится 15–17 млн. лет (примерно с 56 по 39 млн. лет назад). Второй этап связан с внутриродовой дифференциацией и формированием основных групп видов. Он наблюдается у большинства линий семейства, приходится на олигоцен – миоцен и длится 10–11 млн. лет. Дивергенция между *Ranodon* и *Paradactylodon* оценивается как 50/47 млн. лет; дальнейшая дифференциация рода *Paradactylodon* произошла не ранее 43/39 млн. лет. Обособление *Pachyhynobius* могло произойти около 65/49 млн. лет, а *Salamandrella* – около 51/52 млн. лет назад; однако ввиду топологических различий эти оценки малосопоставимы. Разделение между *Hynobius* и общим предком западнокитайских углозубых оценивается в 53/45 млн. лет назад. Начало дифференциации группы западнокитайских углозубов приходится на 46/42 млн. лет, а дивергенция между родами *Batrachuperus* и *Liua* оценивается в 43/40 млн. лет, обособление *Protohynobius* от *Pseudohynobius*, по-видимому, произошло около 36 млн. лет назад (по мтДНК). Дифференциация *Batrachuperus* состоялась около 26/17 млн., а *Liua* около 24/18 млн. лет назад.

Отдельно следует рассмотреть дифференциацию рода *Hynobius*. Начало дифференциации этого рода приходится на конец эоцена — ранний олигоцен (36/31 млн. лет), а формирование основных филогенетических линий этого самого разнообразного рода углозубых заканчивается к концу олигоцена — около 24 млн. лет назад. Род *Hynobius* разнообразен не только благодаря большому количеству видов, но и полиморфизму внешней морфологии, организации кариотипа и экологических стратегий. Монофилия родов *Paradactylodon*, *Liua*, *Pseudohynobius* s. lato и *Hynobius* s. lato делает ненужным их разделение на отдельные роды. Однако значительно более древняя, чем у остальных углозубых, дифференциация и существенные различия между основными филогенетическими линиями этих родов позволяют нам рассматривать их в ранге надродов, а составляющие их линии — в качестве подродов. Вероятно, такая схема адекватно описывает действительное таксономическое разнообразие углозубых. Большинство известных сегодня видов Hynobiidae, согласно данным нашего анализа, — доплейстоценового возраста, что согласуется с оценками возраста большинства видов хвостатых амфибий (Weisrock *et al.*, 2006; Steinfartz *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

**История возникновения филогенетических групп Hynobiidae и их ареалов.** По палеонтологическим и молекулярным данным обособление предка Cryptobranchioidea произошло на территории Азии около 160–170 млн. лет назад. Определить ископаемого общего предка Cryptobranchidae + Hynobiidae пока не удастся, но весьма вероятно, что к границе юрского и мелового периодов линия, приведшая в дальнейшем к Hynobiidae, уже была сформирована. Базальная радиация Hynobiidae в Азии на предка *Onychodactylus* и предка остальных родов произошла, вероятно, в начале верхнего мела. В тот же период или чуть позже (96–100 млн. лет назад) происходит базальная радиация и других крупных семейств Caudata: Plethodontidae, Ambystomatidae s. lato и Salamandridae. Этот этап базальной радиации семейств Caudata хорошо совпадает с верхнемеловым температурным оптимумом, приведшим к значительному повышению среднегодовых температур в высоких широтах. Механизм, объясняющий связь этапов глобального потепления климата и радиации хвостатых земноводных, не ясен. Хвостатые земноводные крайне чувствительны к изменениям температуры и хорошо приспособлены к низким температурам. Можно предположить, что во время значительных потеплений климата могло происходить вымирание многих групп Caudata, фрагментация ранее непрерывных ареалов и, как следствие, ускорение кладогенеза в различных группах. С другой стороны, глобальное потепление климата может приводить к изменению среднего количества осадков, появлению вакантных экологических ниш в районах высоких широт и расселению отдельных групп хвостатых (Zhang, Wake, 2009). Анализ кладогенеза в эволюции Hynobiidae показал наличие двух периодов интенсивной радиации семейства. Первый совпадает с палеоцен-эоценовым температурным оптимумом и продолжается около 15 млн. лет. Короткий период интенсивной радиации Hynobiidae s. str. в палеоцене — эоцене подтверждается небольшими расстояниями между узлами дендрограмм. Ко второй половине эоцена формируются все рецентные роды семейства Hynobiidae. Второй этап радиации Hynobiidae имеет более размытые границы и приходится на внутривидовую дифференциацию и формирование основных групп видов. Максимум узлов филогенетического дерева связан с периодом относительного потепления климата в первой половине миоцена, в это же время определяющее влияние на климат Азии начинает оказывать система летних восточноазиатских муссонов, которые привели к значительному распространению лесного покрова и мезофильной растительности по всему континенту (Sun, Wang, 2005; Jia *et al.*, 2003). Вероятно, эти факторы благоприятствовали расселению углозубых и их радиации, приведшей к формированию новых видовых групп.

Значительную роль в истории Hynobiidae могли играть орогенетические процессы. Контакт Индостана с Азией, вызвавший интенсификацию орогенеза по всему южному краю континента, привел к формированию путей для проникновения углозубов в Среднюю Азию и на Средний Восток. В дальнейшем вызванная поднятием Тибетского нагорья резкая аридизация климата Центральной Азии, вероятно, привела к обособлению западноазиатской ветви семейства (*Ranodon* и *Paradactylodon*), а также разделению между предками *Salamandrella* и других родов восточноазиатских углозубых. Кладогенез в последней группе был, вероятно, связан с быстрым поднятием основных хребтов восточной части Тибетского нагорья в первой половине эоцена,

обособившим предка высокогорных форм западного Китая (*Batrachuperus*, *Liua*, *Pseudohynobius*, *Protohynobius*) от предков *Pachyhynobius* и *Hynobius*. В позднем эоцене идет поднятие хребтов Хэчуаншань и Айлаошань, вызвавшее изменение водоразделов и формирование русла р. Янцзы. Вероятно, это событие могло привести к обособлению предков *Pseudohynobius* — *Protohynobius* и *Batrachuperus* — *Liua*. Усиление альпийского орогенеза в олигоцене формирует сухопутную связь между территориями Среднего Востока и Восточной Европы, что могло способствовать проникновению на запад предков ископаемых *Parahynobius*, известных с миоцена.

К концу эоцена — олигоцену в Восточной Азии постепенно возрастает количество осадков, климат становится более умеренным и мягким, что, вероятно, благоприятствует расселению предка *Hynobius* и формированию основных линий рода. Раньше других, по-видимому, отделяется тайваньская группа видов на южной границе ареала рода. Олигоценовая регрессия приводит к замыканию бассейна Японского моря и формированию сухопутного моста, соединяющего Корейский п-ов, Хонсю, Хоккайдо и Сахалин; формирование Цугарского пролива вызывает, по-видимому, обособление *H. (Satobius) retardatus*. Основные этапы видообразования в родах *Hynobius* и *Onychodactylus* связаны, вероятно, с орогенетическими процессами и неоднократными трансгрессиями уровня моря на территории Восточной Азии в олигоцене — миоцене. Группа восточнокитайских видов подрода *Hynobius* s. str., скорее всего, представляет собой результат проникновения углозубов «прудового» типа на эти территории из северо-восточной Азии. Изменения климата в плиоцене — эоплейстоцене и плейстоценовые климатические колебания приводили к неоднократной фрагментации предковых ареалов с их последующим восстановлением в разных группах углозубых, в том числе в родах *Paradactylodon*, *Batrachuperus*, *Liua*, *Hynobius* и *Salamandrella*.

**IV.4. Генетическое разнообразие семейства Hynobiidae и его изучение.** Сегодня инвентаризация биоразнообразия с помощью методов молекулярной диагностики, или «баркодинга», является необходимым условием его адекватной оценки и разработки соответствующих мер охраны. Молекулярная диагностика особенно актуальна для земноводных, где таксономическое разнообразие существенно недооценено (Vieites *et al.*, 2009). В большинстве групп животных успешно применяется COI-баркодинг, основанный на анализе фрагмента гена цитохром *c*-оксидазы I (Hebert, Gregory, 2005; Hebert *et al.*, 2004), однако ряд авторов сомневались в применимости этого маркера для баркодинга амфибий (Lockridge, Mueller, 2006; Vences *et al.*, 2005a,b). Нами было показано, что COI вполне может применяться в систематических и филогеографических исследованиях хвостатых амфибий, в частности, представителей семейства Salamandridae (Smith *et al.*, 2007). В настоящей работе анализируются последовательности фрагмента гена COI (~655 п.о.) 1073 экземпляров представителей Hynobiidae, более 80% которых являются оригинальными. Согласно результатам нашего исследования, указанный фрагмент корректно идентифицирует роды, виды и внутривидовые группировки представителей Hynobiidae. Обнаружено генетическое единообразие углозубов внутри популяций ( $p \leq 0.001$ ) и при сравнении особей из географически близких популяций одного вида ( $0.001 \leq p \leq 0.01$ ). Некоторые трудности возникают при соотношении значений генетических дистанций при внутривидовых и межвидовых сравнениях. Так, в пределах вида *Onychodactylus fischeri* в его современном понимании  $p$ -дистанции колеблются от 0.0 до 0.13. По нашему убеждению, это отражает прежде всего слабую разработанность системы семейства Hynobiidae; мы придерживаемся разделения на группы видового ранга, учитывающего как генетическую структуру видовых комплексов Hynobiidae, так и их морфологическую и географическую дифференциацию. В таких группировках  $p$ -дистанции при внутривидовых сравнениях не превышают 0.05, а их генетическая обособленность подтверждается как другими мтДНК маркерами, так и данными анализа яДНК-маркеров и, в ряде случаев, морфологии. Генетические дистанции между видами одного рода в большинстве групп Hynobiidae колеблются между 0.05 и 0.09, в ряде реликтовых групп (например, *Onychodactylus*, *Batrachuperus*, *Liua*, *Pseudohynobius*) достигают 0.11–0.12. Генетические дистанции между разными родами Hynobiidae превышают 12%. В некоторых родах (*Paradactylodon*, *Pseudohynobius*) ряд форм обособлены еще значительно (0.13–0.15), что согласуется с их морфологической обособленностью; вероятно, их следует рассматривать в ранге подродов. Фрагмент гена COI

оказался высокоэффективным маркером для выявления криптического разнообразия в семействе Hynobiidae. Нами было выявлено 17 митохондриальных линий, которые не могут быть однозначно отнесены ни к одному из известных сегодня видов, причем 8 из этих линий не образуют монофилетических групп с популяциями видов, к которым они относились ранее. Дифференциация еще 5 линий приближается к видовому уровню. Мы рассматриваем эти формы как *потенциальные* неописанные таксоны видового ранга. Несомненно, для принятия каких-либо таксономических решений требуются дополнительные исследования ядерных маркеров и морфологических признаков, однако в качестве метода экспресс-оценки генетического разнообразия Hynobiidae COI-баркодинг показал свою высокую эффективность. Большое количество новых форм выявлено в роде *Onychodactylus*, где традиционно предполагается наличие лишь 2 видов. Согласно нашим данным, в его составе имеется как минимум 7 линий, филогенетическая обособленность которых подтверждается и данными анализа яДНК маркеров. Нами показана значительная обособленность 4 криптических форм рода *Batrachuperus*, выявленных ранее по мтДНК и аллозимным данным (Fu *et al.*, 2001; Fu, Zeng, 2008). 8 обособленных криптических форм выявлено в составе рода *Hynobius*, причем обособленность 5 из них подтверждается анализом яДНК-маркеров. И напротив, дифференциация ряда признанных видов (*Paradactylodon gorganensis*, *Batrachuperus cochranae*, *Hynobius guabangshanensis*, *H. tenuis*, *H. mantchuricus*) согласно данным COI-баркодинга явно недостаточна для придания им видового статуса, и их следует рассматривать как младшие синонимы или подвиды. Очевидно, что таксономическое разнообразие Hynobiidae существенно недооценено, что необходимо учитывать при оценке природоохранного статуса видов и их популяций. Для определения таксономического статуса выявленных форм необходимы дополнительные исследования.

**IV.5. Современная филогенетическая и таксономическая структура семейства Hynobiidae.** В этом разделе рассматриваются результаты проведенного филогенетического анализа применительно к таксономии семейства Hynobiidae. Помимо выявленных форм потенциально видового ранга, показана филогенетическая неоднородность Hynobiidae, связанная с различными этапами истории семейства. Это должно быть, по нашему мнению, отражено в таксономической структуре Hynobiidae. До последнего времени признавалось наличие двух подсемейств — Hynobiinae и Protohynobiinae (Fei, Ye, 2000); эта система потеряла свою актуальность с синонимизацией *Protohynobius* с *Pseudohynobius* (Peng *et al.*, 2010). Выделение таксонов надродового ранга необходимо в случае нарушения монофилии и / или принципиальных отличий рассматриваемых форм; в ряде случаев мы считаем такое выделение необходимым. То же касается и значительно обособленных групп видов, которые, вероятно, имеет смысл рассматривать в ранге подродов. С учетом необходимости дальнейших исследований мы придерживаемся следующей предварительной системы семейства (подчеркиванием выделены неописанные таксоны, в скобках указано число признаваемых видов / число таксонов видового ранга, выявленных в настоящем исследовании).

**Отряд Caudata FISCHER VON WALDHEIM, 1813 — Хвостатые земноводные**

**Подотряд Cryptobranchoidea DUNN, 1922 — Скрытожаберникообразные**

**Семейство Hynobiidae COPE, 1859 — Углозубые**

**† Группа ранга подсемейства — Древние углозубы**

† Род *Liaoxitriton* DONG & WANG, 1998 — Древние углозубы (2 вида)

**Группа ранга подсемейства – Когтистые безлёгочные тритоны**

Род *Onychodactylus* TSCHUDI, 1838 — Когтистые безлёгочные тритоны (2/7 видов)

**Подсемейство Hynobiinae COPE, 1859 — Настоящие углозубы**

**Группа ранга трибы — Настоящие лягушкозубы**

Род *Ranodon* KESSLER, 1866 — Лягушкозубы (1 вид)

Род *Paradactylodon* RISCH, 1984 — Средневосточные углозубы

Подрод *Paradactylodon* RISCH, 1984 — Персидские углозубы (2/1 вид)

Группа ранга подрода — Афганские углозубы (1 вид)

**Группа ранга трибы — Коренастые углозубы**

Род *Pachyhynobius* FEI, QU, & WU, 1983 — Коренастые углозубы (1 вид)

### Группа ранга трибы — Настоящие углозубы

Род *Salamandrella* DUBOWSKI, 1870 — Сибирские углозубы (2 вида)

### Группа родов — Западнокитайские углозубы

Род *Batrachuperus* BOULENGER, 1878 — Высокогорные углозубы (6/10 видов)

Род *Liua* ZHAO & HU, 1983 — Китайские лягушкозубы

Подрод *Liua* ZHAO & HU, 1983 — Ушаньские лягушкозубы (1 вид)

Группа ранга подрода — Ложные лягушкозубы (1 вид)

Род *Pseudohynobius* FEI & YE, 1983 — Пятнистые лягушкозубы

Подрод *Protohynobius* — Реликтовые лягушкозубы (1 вид)

Подрод *Pseudohynobius* FEI & YE, 1983 — Пятнистые лягушкозубы (4 вида)

### Группа родов — подродов — Настоящие углозубы

Род *Hynobius* TSCHUDI, 1838 — Углозубы

Подрод *Satobius* ADLER & ZHAO, 1990 — Хоккайдские углозубы (1 вид)

Группа ранга подрода — Тайваньские углозубы (5/7 видов)

Подрод *Pachypalaminus* THOMPSON, 1912 — Ручьевые японские углозубы (4/7 видов)

Подрод *Hynobius* TSCHUDI, 1838 — Настоящие углозубы (21/25 видов)

### **Hynobiidae — группы *Incertae Sedis*:**

† Род *Parahynobius* VENCZEL, 1999 — Европейские углозубы (2/3 вида)

† Род *Prohynobius* FEI & YE, 1983 (?)

Вероятно, ошибочно отнесены к «*Hynobius*»: *H. turkestanicus* (?), *H. huayuanensis*

## **ВЫВОДЫ**

1. По совокупности морфологических, цитогенетических и молекулярных признаков семейство Hynobiidae монофилетично. Вероятно, его общий предок был малоспециализированной горной формой (подобно современному роду *Ranodon*), возможно, родственной ископаемому *Liaoxitriton* из северо-восточного Китая; раннемеловой возраст последнего хорошо согласуется с молекулярными датировками времени формирования Hynobiidae. Внутри этого базального, мало специализированного семейства хвостатых амфибий обнаружена, однако, значительная генетическая дифференциация. Встречающиеся параллелизмы могли быть обусловлены педоморфозами (у ручьевых форм) либо специализацией наземных форм.
2. Согласно основанной на оригинальных филогенетических данных схеме эволюции хромосомных наборов Hynobiidae, основные эволюционные изменения кариотипа состоят в его выравнивании за счет уменьшения доли телоцентрических хромосом и постепенном сокращении числа хромосом. По-видимому, эти изменения происходили параллельно и независимо в разных линиях семейства. Число хромосом, вероятно, неоднократно изменялось и в эволюции рода *Hynobius*, в котором оно связано скорее с морфо-экологическими типами, а не с филогенетическими группами углозубов. Четких взаимосвязей между филогенетическим положением и размером генома в пределах Hynobiidae не выявлено.
3. Полученные на основе анализа мтДНК и яДНК филогенетические схемы эволюции семейства Hynobiidae в значительной степени совпадают между собой по топологии. Датировки филогенетических событий моложе 50 млн. лет, полученные по мтДНК и яДНК, достаточно полно согласуются между собой. Ряд топологических противоречий может объясняться различными механизмами и скоростями эволюции митохондриального и ядерного геномов. Неодинаковые оценки времен дивергенции по данным анализа яДНК и мтДНК относятся к случаям узких временных диапазонов между эволюционными событиями.
4. Комплексный филогенетический анализ продемонстрировал монофилетическое происхождение всех признаваемых сегодня родов Hynobiidae. Роды *Paradactylodon*, *Liua*, *Pseudohynobius* и наиболее разнообразный род *Hynobius* отличаются значительно более древней, чем у других родов, дифференциацией и представлены рядом хорошо очерченных групп, что, по нашему мнению, позволяет рассматривать их в качестве подродов.
5. По морфологическим и цитогенетическим признакам, особенностям биологии и проанализированным ДНК-маркерам род *Onychodactylus* представляет собой крайне

специализированную форму, наиболее обособленную в семействе Hynobiidae и заслуживающую ранга семейства или надсемейства. Молекулярно-генетический и морфологический анализ выявил наличие не менее 5 форм *Onychodactylus* видового статуса.

6. Таксономическое разнообразие семейства Hynobiidae существенно недооценено. Не менее 17-ти выявленных молекулярно-генетическими методами форм не могут быть отнесены ни к одному из признаваемых сегодня таксонов семейства Hynobiidae и, вероятно, представляют собой самостоятельные виды. Многие криптические виды в составе родов *Onychodactylus*, *Batrachuperus* и *Hynobius* являются узкоареальными ручьевыми горными формами, что подтверждает определяющую роль горных местообитаний в видообразовании земноводных. Исследованный фрагмент первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы является эффективным ДНК-маркером для идентификации видов и родов углозубых, а также позволяет оценивать примерную филогеографическую структуру ареалов и генетическую обособленность отдельных популяций.
7. Центр происхождения и таксономического разнообразия углозубых — Восточная Азия. Формирование семейства произошло на границе юрского и мелового периодов, базальная радиация — в середине мелового, вторая радиация — в палеоцене — эоцене (время температурного оптимума), третья — в олигоцене-миоцене (время становления муссонного климата в Восточной Азии). Ископаемые формы углозубых из позднего миоцена — раннего плейстоцена Восточной Европы (*Parahynobius*), вероятно, являются результатом олигоценовой или миоценовой колонизации. На дифференциацию семейства преимущественное влияние оказывали, по-видимому, такие внешние факторы, как глобальные потепления климата, орогенез, изменения уровня моря, формирование гидросети и аридизация в Азии и другие.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Краткая история таксономических и филогенетических исследований семейства Hynobiidae.** В приложении рассматривается история изучения семейства Hynobiidae, отдельно освещаются роль углозубов в культуре народов Азии и ранние исследования представителей семейства европейскими учеными в XIX веке. Кратко обобщаются исследования систематики семейства Hynobiidae в XX веке на территории Японии, Кореи, Тайваня, континентального Китая, Среднего Востока и бывшего СССР. Суммированы основные проблемы таксономии семейства Hynobiidae. Приводится обзор основных взглядов на филогенетические связи между представителями Hynobiidae, обзор кариологических и цитогенетических исследований семейства, а также основные достижения молекулярной филогенетики в изучении филогении и систематики углозубов. Приводится краткая характеристика мтДНК хвостатых амфибий, а также обзор использования маркеров ядерной ДНК в систематике амфибий. Суммированы основные события палеогеографии и палеоклимата Азиатского континента в мезозое — кайнозое.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Диагностический ключ для определения видов семейства Hynobiidae.** Разработан оригинальный ключ, позволяющий идентифицировать всех известных представителей семейства Hynobiidae с точностью до вида или подвида.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Современная таксономическая структура семейства Hynobiidae.** В приложении приводится список названий, предложенных для представителей семейства Hynobiidae, предлагается новый вариант системы и дается таксономический очерк семейства, в котором для каждого таксона семейства приводятся синонимика, тривиальные названия, сведения по распространению и таксономический комментарий.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Исследованный материал.** В приложении дается список исследованного коллекционного материала с указанием количества экземпляров и ссылки на использованные в филогенетическом анализе последовательности ДНК, опубликованные в генбанке NCBI.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Протоколы исследований.** В приложении приводятся последовательности праймеров, протоколы исследований, использованные при молекулярно-генетическом анализе, оценке размера генома и хромосомном анализе.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 6. Данные кладистического анализа морфологических признаков.** Приводится описание исследованных признаков, использованных в филогенетическом анализе, и общая матрица данных для анализа морфологических признаков.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 7. Анализ полученных последовательностей ДНК.** В приложении приводятся матрицы генетических дистанций и другие данные молекулярного анализа.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Я выражаю глубочайшую благодарность своему научному руководителю профессору, доктору биол. наук Б.Д. Васильеву. Я благодарю проф. А.С. Северцова за рецензирование рукописи. Я искренне признателен за поддержку, советы и всестороннюю помощь при выполнении работы А.А. Банниковой, А.В. Борисенко, Э.И. Воробьевой, Д.Б. Вэйку, М.Х. Вэйк, А.С. Графодатскому, Н.В. Ивановой, С.Л. Кузьмину, М. Куро-о, В.С. Лебедеву, Д. Родригесу-Виэйтесу, М.В. Холодовой и Я.-П. Чжану. От всего сердца я благодарю К. Адлера, Э.В. Андагулова, М. Аояма, Я.В. Арнтцена, И.В. Артюшина, Ф. Ахмадзадэ, И. Ахметова, М.Г. Буш, А.В. Бушуева, Х. Валлайса, Ж.-Цз. Вана, Н. Вана, А.Б. Васильеву, В.А. Васильева, А.А. Веденина, П. Гайсслера, Ю. Гао, В. Гартунга, Т. Джонсона, С.И. Долотовскую, Е.А. Дунаева, Ф.С. Жирова, К. Иидзука, Л.В. Капитонову, Р. Катакура, А.А. Кидова, А.В. Коваленко, Х. Коиси, А.А. Колесникова, А.Н. Кузнецова, Цз.-С. Лая, М.-Е. Ли, Ш.-Ф. Ли, Х. Ли, С.-М. Лина, Г.-Я. Лю, С.М. Ляпкина, И.В. Маслову, В.А. Матросову, М.-С. Мин, К.В. Минина, Т. Накадзато, А. Ньето-Роман, Д.-С. Пака, Т. Папенфусса, Ф. Пасманса, Я. Поляка, Ю.С. Равкина, А.А. Распопову, А.В. Рассказову, Ж. Рафаэлли, Е.С. Решетникову, С.Н. Романенко, Н. Сабери-Наджафи, К.С. Саркисяна, С.К. Семенову, И.А. Сербинову, Т. Сибата, У.В. Симакову, П.П. Скучаса, А. Смита, Е.Н. Соловьеву, М. Спарребоме, А. Танабэ, Б.И. Тимофеева, Цз.-Чж. Фу, Т.-Чж. Хуана, С.-М. Цзэн, М. Чжана, У.-Цз. Чжана, Ю.-Х. Чжана, В. Чжуна, М.А. Чирикову, Х. Читсазана, Цз. Чэ, Н.А. Щипанова, П.Д.Н. Эбера, Х.А. Эрнандеса-Бланко, Г. Эшперкейра-Темуду, Ч.-В. Ю и В.В. Яшина за предоставление для настоящей работы собственных материалов, помощь при организации и проведении полевых и лабораторных исследований, помощь в работе с литературой, плодотворное обсуждение работы и за постоянную поддержку. Я признателен заведующим секциями герпетологии и кураторам коллекций ряда музеев за возможность работы с коллекциями. Я очень благодарен моим родителям А.К. Михальской и А.Д. Пояркову и другим членам моей семьи, а также моим друзьям за безграничное терпение и поддержку.

Ряд исследований был проведен на средства грантов AmphibiaTree (NSF; EF-0334939); Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-10198), Martin Fellowship (Naturalis), стипендии «Токио Бозки (Рус)», а также NSERC, Genome Canada, Gordon and Betty Moore Foundation, Canada Foundation for Innovation и Ontario Innovation Trust при поддержке Canadian Centre for DNA Barcoding (BIO, ON, Canada).

### ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

#### Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Воробьева Э.И., Хинчлифф Дж.Р., Медников Д.Н., **Поярков Н.А.**, 2006. Онтогенетические преобразования конечностей у *Triturus karelinii* и *T. dobrogicus* — представителей подрода *T. cristatus* (Caudata) // Доклады РАН. Т. 406. № 1–6. С. 266–271. (Опубл. на английском языке: *Doklady Biological Sciences*. 2006. V. 406. № 1–6. P. 52–56.)
2. **Поярков Н.А.**, Кузьмин С.Л., 2008. Филогеография сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii*) по данным последовательностей митохондриальной ДНК // Генетика. Т. 44. № 8. С. 1089–1100. (Опубл. на английском языке: *Russian Journal of Genetics*. 2008. V. 44. № 8. P. 948–958.)
3. Кузьмин С.Л., **Поярков Н.А.**, Цзэн С.-М., 2008. К филогеографии и таксономии центральноазиатских углозубых (Amphibia, Hynobiidae) // Зоологический журнал. Т. 87. № 6. С. 702–709.
4. Кузьмин С.Л., **Поярков Н.А.**, Маслова И.В., 2010. Об изменчивости жерлянок Дальнего Востока (*Bombina orientalis* (Boulenger, 1890); Anura: Bombinatoridae): данные морфологии

и митохондриальной ДНК // *Вестник МГУ*. № 1. С. 40–45. (Опублик. на английском языке: *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2010. V. 65. № 1. P. 34–39.)

**Работы, опубликованные в других изданиях:**

5. Babik W., Branicki W., Crnobrnja-Isailović J., Cogălniceanu D., Sas I., Olgun K., **Poyarkov N.A.**, Garcia-Paris M., Arntzen J.W., 2005. Phylogeography of two European newt species — discordance between mtDNA and morphology // *Molecular Ecology*. V. 14. P. 2475–2491.
6. Smith A.M., **Poyarkov N.A.**, Hebert P.D.N., 2008. CO1 DNA barcoding amphibians: take the chance, meet the challenge // *Molecular Ecology Notes*. V. 8. № 2. P. 235–246.
7. Wielstra B., Espregueira Themudo G., Güclü Ö., Olgun K., **Poyarkov N.A.**, Arntzen J.W., 2010. Cryptic diversity at the Eurasian transition: molecular biogeography of the southern crested newt *Triturus karelinii* // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. V. 56. P. 888–896.

**Тезисы докладов и материалы конференций:**

8. **Поляров Н.А.**, 2003. Таксономическое разнообразие и распространение тритонов рода *Triturus* Rafinesque, 1815 (Amphibia, Salamandridae): подходы к пониманию эволюции группы // *Материалы X международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2003»*. С. 44.
9. **Poyarkov N.A.**, 2003. Analysis of Patterns of Amphibian Distribution: The Case of Caucasian Banded Newt, *Triturus vittatus ophryticus* (Berthold, 1846) // *Proceedings of the 12th OGM SEH*. P. 133.
10. **Поляров Н.А.**, 2004. Молекулярная систематика и подвидовая структура малоазиатского тритона *Triturus vittatus* (Gray, 1835) (Amphibia: Salamandridae) // *Материалы XII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004»*. С. 15.
11. **Poyarkov N.A.**, 2005. Evolutionary history of banded newt, *Triturus vittatus* (Gray, 1835), Salamandridae, based on molecular, morphological and behavioural data // *Abstracts of the 13th OGM SEH*. P. 89–90.
12. **Poyarkov N.A.**, Chernyshev K.I., Serbinova I.A., 2005. Hybridization between smooth and carpathian newts (*Triturus vulgaris* (Linnaeus, 1758) and *Triturus montandoni* (Boulenger, 1880); Salamandridae) in Ukrainian Transcarpathia: morphological and allozyme evidences // *Abstracts of the 13th OGM SEH*. P. 90.
13. **Poyarkov N.A.**, Kuzmin S.L., Kholodova M.V., Vorobyeva E.I., 2005. Phylogeography of Siberian newt, *Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870, Hynobiidae, derived from mitochondrial DNA sequences // *Abstracts of the 13th OGM SEH*. P. 91.
14. **Poyarkov N.A.**, Min M.-S., Kuzmin S.L., 2007. Molecular and morphological patterns in evolution of Asian salamanders (family Hynobiidae) // *Abstracts of the 14th OGM SEH*. P. 119.
15. **Poyarkov N.A.**, Smith, A.M., Hebert P.D.N., 2007. Amphibian COI-barcoding and its application to taxonomy of European newts (genera *Mesotriton*, *Ommatotriton*, *Lissotriton*, *Triturus*) (Salamandridae) // *Abstracts of the 14th OGM SEH*. P. 276.
16. Dunayev E. A., **Poyarkov N.A.**, Ivanova N., Borisenko A., Duisebayeva T.N., Hebert P.D.N., 2007. Molecular perspective on the evolution and barcoding of toad-headed agamas (genus *Phrynocephalus*, Agamidae) in Middle Asia // *Abstracts of the 14th OGM SEH*. P. 208.
17. Dolotovskaya S.I., **Poyarkov N.A.**, Chirikova M., Solovyeva E.N., Wan L.-X., Orlova V. F., 2007. Molecular and morphological differentiation of rapid racerunner *Eremias velox* (Lacertidae) with comments on taxonomy and biogeography of Middle-Asian racerunners // *Abstracts of the 14th OGM SEH*. P. 203.
18. Orlova V.F., **Poyarkov N.A.**, Chirikova M., Dolotovskaya S.I., 2007. Preliminary molecular phylogeography of wide-spread steppe-runner lizard — *Eremias arguta* (Lacertidae) and considerations on its subspecific structure // *Abstracts of the 14th OGM SEH*. P. 263.
19. Nakamura M., **Poyarkov N.A.**, Zeng X.-M., Kuro-o M., 2009. Molecular phylogeny of hynobiid salamanders based on high repetitive DNA // *Abstracts of the 47th Annual Meeting of the Herpetological Society of Japan. Bulletin of the Herpetological Society of Japan*. V. 1. P. 50.
20. Соловьева Е.Н., **Поляров Н.А.**, 2009. Особенности систематики и филогеографии видового комплекса такырных круглоголовков *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia,

- Agamidae) с использованием ГИС-картирования // *Тезисы XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009»*. С. 145.
21. **Poyarkov N.A.**, Kuro-o M., Che J., Iizuka K., Min M.-S., Vieites D.R., 2009. Molecular differentiation and cryptic diversity in the Asian clawed salamanders, genus *Onychodactylus* (Amphibia, Caudata, Hynobiidae) // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 67.
  22. **Poyarkov N.A.**, Tarkhnishvili D.N., Arntzen J.W., 2009. Around the Black Sea – comparative phylogeographic patterns in four groups of salamanders (Salamandridae, Caudata) // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 73.
  23. Özdemir N., **Poyarkov N.**, Kutrup B., Doglio S., Tosunoglu M., Gül S., 2009. Phylogeny of the *Pseudoepidalea viridis* (Laurenti, 1768) in Turkey // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 164.
  24. Dunayev E.A., **Poyarkov N.A.**, Matrosova V.A., Solovyeva E.N., Dujsebayeva T.N., Munkhbayar Kh., 2009. Phylogeographic patterns in *Phrynocephalus guttatus* — *Phrynocephalus versicolor* species complex (Reptilia: Agamidae) from Central Asia // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 117.
  25. Solovyeva E.N., **Poyarkov N.A.**, Dunayev E.A., Dujsebayeva T.N., Nazarov R.A., Munkhbayar Kh., Cheatsazan H., 2009. Taxonomy and phylogeography of the sunwatcher toad-headed agama species complex (*Phrynocephalus helioscopus* and *Phrynocephalus persicus*; Reptilia: Agamidae) // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 158.
  26. Dolotovskaya S.I., **Poyarkov N.A.**, Nazarov R.A., Orlova V.F., 2009. Systematics and phylogeography of the Middle-Asian racerunners (*Eremias*, subgenus *Dimorphea*; Reptilia: Squamata, Lacertidae) // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 77.
  27. Chang Y.-H., **Poyarkov N.A.**, Vassilieva A.B., Lai J.-Sh., 2009. Reproduction biology, behaviour and ontogeny in Formosan salamander, *Hynobius formosanus* (Caudata: Hynobiidae), from Taiwan // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 108.
  28. Chang Y.-H., **Poyarkov N.A.**, Kuro-o M., Lai J.-Sh., Lue K.-Y., 2009. Phylogenetic position of the Taiwanese salamanders (genus *Hynobius*, Hynobiidae, Caudata) inferred from molecular, morphological and karyological data // *Abstracts of the 15th OGM SEH*. P. 141.
  29. Solovyeva E.N., **Poyarkov N.A.**, Dunayev E.A., Bannikova A.A., 2010. Phylogeny of the sunwatcher agama species complex, *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia, Agamidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers // *Тезисы 2-й Московской международной конференции «Молекулярная филогенетика MolPhy-2»*. P. 71.
  30. Соловьева Е.Н., **Поляков Н.А.**, 2010. Анализ распространения видового комплекса такырной круглоголовки *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia: Agamidae). // *Тезисы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010»*. С. 142.
  31. Ananjeva N., Melnikov D., Nazarov R., **Poyarkov N.**, 2010. Preliminary data on DNA Barcoding of Agaminae with some taxonomical comments // *De Agamis 2: Abstracts of the 2d International Symposium on Agamid Lizards*. P. 11.
  32. Dunayev E.A., **Poyarkov N.A.**, 2010. Phylogeny, phylogeography and identification of Asian toad-headed agamas *Phrynocephalus* (superspecies *versicolor*) // *De Agamis 2: Abstracts of the 2d International Symposium on Agamid Lizards*. P. 13.