

УДК 575.86:599.322.2

ФИЛОГЕНИЯ И СИСТЕМАТИКА СУРКОВ (*Marmota*, Sciuridae, Rodentia), ОСНОВАННЫЕ НА ДАННЫХ интер-SINE-ПЦР

© 2010 г. О. В. Брандлер¹, Е. А. Ляпунова¹, А. А. Банникова², Д. А. Крамеров³

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва 119334;
e-mail: rusmarmot@yandex.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра зоологии позвоночных, Москва 119992

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991

Поступила в редакцию 30.01.2009 г.

Филогенетические связи и таксономические отношения в роде сурков *Marmota* исследовали методом интер-SINE-ПЦР. Использовали праймеры, комплементарные консенсусным последовательностям двух коротких ретропозонов MIR и B1-dID. Полученные данные отражают длительную географическую изоляцию неарктических и палеарктических сурков, но не поддерживают подродового деления в связи со сравнительно низкими генетическими различиями между ними. Подтверждается выделение внутриродовых групп видов *bobak* и *samtschatica*, но не *caudata*. На основании сравнения различий митохондриального и ядерного геномов признается возможность давней гибридизации *M. menzbieri* и *M. caudata*. Находит подтверждение видовая самостоятельность *M. kastschenko* в составе предложенного надвида *M. baibacina*.

Голарктический род *Marmota* включает в себя формы, находящиеся на разных уровнях дифференциации. Среди них имеются хорошо морфологически и генетически дифференцированные симпатрические и семисимпатрические виды, аллопатрические виды и виды и формы, находящиеся на начальной стадии дивергенции. Неоднократные возникновения и исчезновения Берингийской суши, поддающиеся достаточно точной датировке, дают возможность определять время миграций и, соответственно, дивергенций некоторых форм. Имеющиеся палеонтологические находки сурков как в Старом, так и в Новом Свете позволяют сопоставлять данные генетического анализа с палеонтологической летописью. Все это делает сурков удобной модельной группой для изучения эволюционных процессов.

Филологии и систематике сурков посвящено достаточно много работ, основанных на анализе как классических морфологических признаков, палеонтологических данных и экологических особенностей [1–3 и др.], так и различий в звуковой сигнализации [4], кариотипических [5], биохимических [6] и иммуногенетических признаков [7]. Система рода *Marmota* разработана достаточно хорошо. Однако имеется ряд спорных вопросов, связанных с недостаточно четким диагнозом ряда таксонов, трансгрессией морфологических признаков и наличием переходных форм. В частности, таксономический статус форм *baibacina*, *bobak*, *sibirica*, *himalayana*, объединяемых различными авторами в разных комбинациях в так называемую группу *bobak*, является предметом длительной дискуссии систематиков с начала про-

шлого века до наших дней. Использование молекулярно-генетических маркеров стало в последнее время почти обязательным условием объективности филогенетических и таксономических заключений. Первые работы, посвященные суркам, выполненные с использованием метода ДНК-ДНК-гибридизации [8], позволили оценить время отделения сурков от основного ствола наземных беличьих. Широкое применение молекулярно-генетических маркеров для изучения филологии и систематики сурков было начато с секвенирования гена цитохрома b [9–11]. Позже М. Херрон и др. [12] использовали данные С. Степана и др. [10] для построения филологии Sciuridae. Полученные на основании этого результаты в некоторых случаях противоречат сложившимся представлениям. Это касается внутриродовой систематики и филогенетических отношений ряда форм. В частности, было предложено деление рода *Marmota* на два подрода *Marmota* и *Petromarmota* [10], при этом в состав первого, кроме всех палеарктических сурков, вошли *M. monax* и *M. broweri*, а во второй — все остальные неарктические сурки. Кроме того, “хорошие” морфологические виды *M. caudata* и *M. menzbieri* генетически оказались чрезвычайно близкими. Для объяснения этого феномена нами была выдвинута гипотеза давней гибридизации этих видов, оставившей след в митохондриальном геноме, к которому относится *cyt b* [13].

Последние исследования хромосомных наборов сурков внесли изменение в таксономию рода. На основании кариотипических особенностей была обоснована видовая самостоятельность

M. kastschenkoi ($2n = 36$), ранее считавшегося подвидом *M. baibacina* ($2n = 38$) [14]. При недостаточности четких морфологических отличиях оставался неизвестным уровень их генетической дивергенции. Кроме того, исследование кариотипов палеарктических сурков показало их консервативность у наиболее морфологически и генетически дивергировавших видов [15].

Таким образом, молекулярная эволюция рода *Marmota* остается не до конца проясненной. Данные исследований митохондриального генома не соответствуют классическим представлениям, что возможно связано с известными ограничениями в применении митохондриальных маркеров. Темпы кариотипической, морфологической и митохондриальной эволюции сурков оказываются несопряженными, что требует введение в анализ независимых маркеров ядерной ДНК.

В настоящей статье представлены результаты исследования молекулярной изменчивости видов и внутривидовых подразделений рода *Marmota* методом полиморфизма длин участков ДНК, фланкируемых короткими диспергированными повторами, или SINEs. Данный метод мультилокусного анализа ядерной ДНК интер-SINE-ПЦР (Inter-SINE-PCR) позволяет получить интегральную оценку изменчивости ядерного генома. Применимость этого метода для изучения филогенеза млекопитающих обоснована при изучении межвидовой таксономической структуры у насекомых, рукокрылых и приматов [16–18].

В данной работе основное внимание уделено филогенетическим связям палеарктических сурков, составу группы bobak, оценке генетических отличий *M. menzbieri* и *M. caudata*, а также внутри группы серых сурков. Кроме того, исследуется правомочность подродового деления *Marmota*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследованы образцы от 51 особи 13 из 15 видов сурков мировой фауны (табл. 1). В качестве внешней группы в филогенетическом анализе использован длиннохвостый суслик *Spermophilus undulatus*.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из замороженных и хранившихся при температуре -80°C или фиксированных этанолом тканей (почки, печень и мышцы) методом фенол-хлороформной депротеинизации после обработки гомогената тканей протеиназой K [19].

Условия интер-SINE-ПЦР. В данной работе использовали семейство SINE, называемое MIR (mammalian interspersed repeat), широко распространенное в геномах позвоночных [20], и семейство SINE B1-dID [21], свойственное грызунам семейств Sciuridae, Aplodontidae и Gliridae [22–24].

Интер-MIR-ПЦР проводили с парой праймеров MIR17/MIL17. Их последовательности, условия амплификации и электрофоретического разделения меченных радиоактивным фосфором продуктов амплификации в полиакриламидном геле подробно описаны в предыдущих публикациях [16, 18].

В B1-ПЦР использовали праймер Mar17 – 5'-GCGCCACTACACCTGGC-3', комплементарный началу элемента B1-dID. B1-специфичную реакцию амплификации осуществляли при следующих условиях: денатурация – 94°C , 30 с; отжиг – 60°C , 45 с; синтез – 72°C , 2 мин. Число циклов – 27. Предварительная денатурация продолжалась 3 мин при 94°C ; конечный синтез – 5 мин при 72°C . Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили так же, как и при интер-MIR-ПЦР.

Филогенетический анализ. Фингерпринты, полученные в MIR- и B1-ПЦР, были преобразованы в бинарную матрицу (1 – присутствие полосы, 0 – отсутствие), которую анализировали методом максимальной экономии Вагнера (maximum parsimony – MP) в пакете PAUP 4.0b4a [25] и методами ближайшего связывания (neighbor-joining – NJ) и UPGMA в программе TREECONW [26]. Для оценки статистической достоверности группировок, получаемых методами NJ и MP, использовали бутстрэп-анализ по 1000 репликам. Генетические расстояния (D_{NL}) рассчитаны по алгоритму Нея и Ли [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые для проведения интер-SINE-ПЦР в качестве молекулярного маркера использован димерный ретропозон B1-dID. Полученные в результате применения этого маркера фингерпринты (рис. 1) позволили идентифицировать 94 признака, из которых 67 оказались парсимониально информативными.

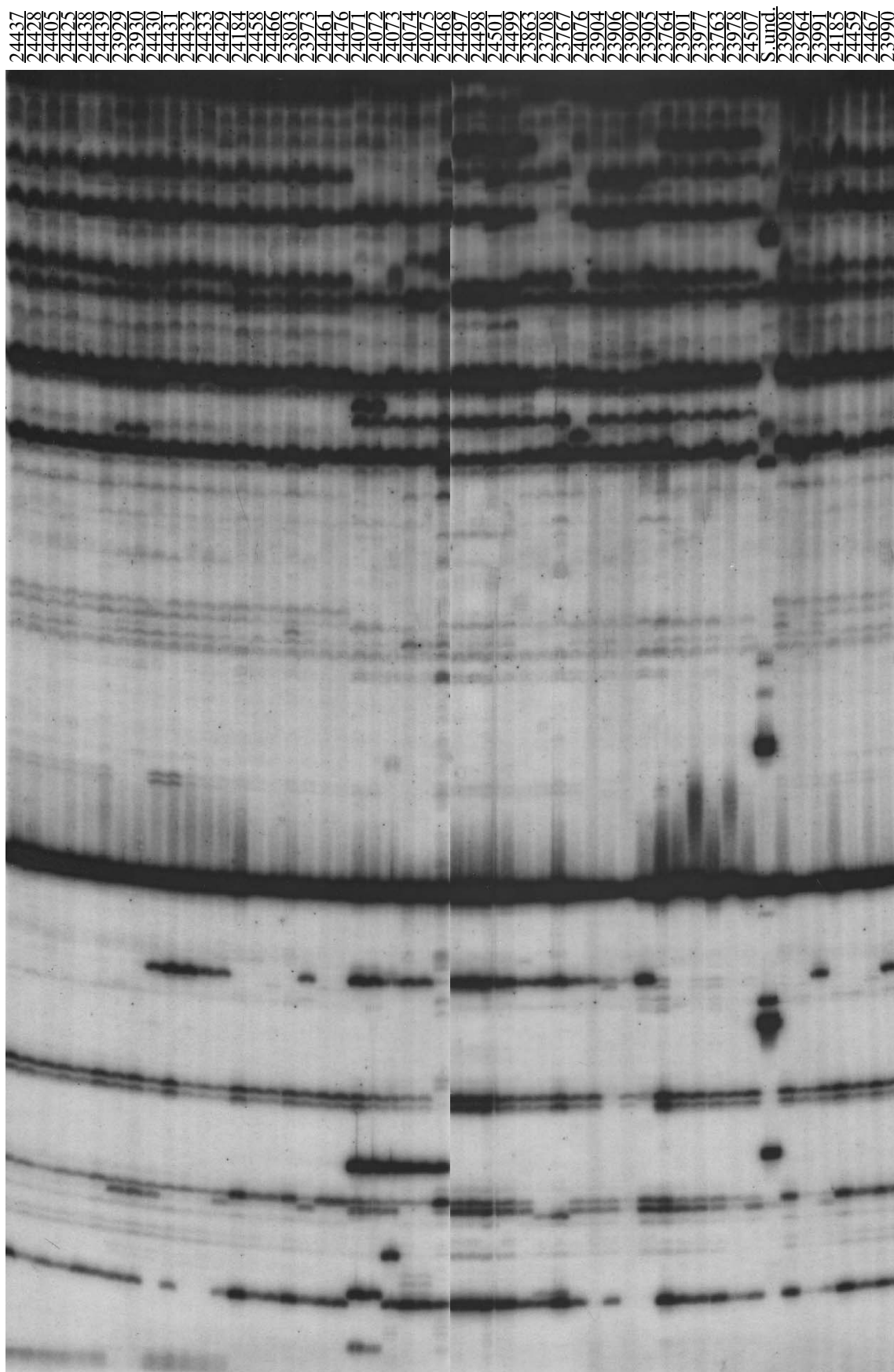
Исследованные образцы сурков как на парсимониальных, так и на дистанционных деревьях, построенных по результатам интер-MIR- и интер-B1-ПЦР, группируются в соответствии со своей видовой принадлежностью. На всех деревьях выделяется группа, объединяющая североамериканских сурков. Низкие бутстрэп-поддержки для большинства узлов ветвления этих деревьев делают их неразрешенными для позиционирования большинства палеарктических видов. Объединение бинарных матриц интер-MIR- и интер-B1-ПЦР позволяет получить суммарное дерево интер-SINE-ПЦР для этих данных с более высокой бутстрэп-поддержкой, которое и обсуждается далее.

Топология суммарного парсимониального дерева (MP, 134 парсимониально информативных признака из общего числа 217) и дерева ближай-

Таблица 1. Характеристика изученного материала

Вид (подвид)	Место отлова	n	Коллекционные номера (в скобках оригинальные номера коллекторов)
<i>M. baibacina baibacina</i>	РФ, Алтай, Кош-Агачский р-н, 50 км к Ю-В от п. Кош-Агач, хребет Сайлюгем, р. Бураты; 49°30' с.ш., 88°30' в.д.	5	24429, 24430, 24431, 24432, 24433
<i>M. b. centralis</i>	Казахстан, Алма-Атинская обл., хребет Кетмень, ущелье Большой Кокпак; 43° с.ш., 80° в.д.	2	23929, 23930
<i>M. bobak bobak</i>	Украина, Харьковская обл., Великобурлукский р-н; 50° с.ш., 37°20' в.д.	2	23803, 23908
<i>M. b. schaganensis</i>	Казахстан, Целиноградская обл., окр. п. Кургальджино; 50°30' с.ш., 70° в.д.	1	23991
<i>M. b. kozlovi</i>	РФ, Саратовская обл., Вольский р-н, окр. п. Черкасское; 52°30' с.ш., 47°15' в.д.	2	24466, 24467
	РФ, Саратовская обл., Вольский р-н, окр. с. Никольское, лев. берег р. Алай; 52°25' с.ш., 47°05' в.д.	1	24476
<i>M. bobak ssp.</i>	РФ, Саратовская обл., Озинский р-н, окр. п. Модин; 51°15' с.ш., 49°30' в.д.	3	24458, 24459, 24461
	РФ, Оренбургская обл., Кувандыкский р-н, 5 км Ю д. Мухамедьярово; 51°30' С, 57°20' в.д.	2	24184, 24185
	РФ, Оренбургская обл., Первомайский р-н; 51°30' с.ш., 55° в.д.	1	23964
	РФ, Оренбургская обл., Саракташский р-н, 8 км С-В от с. Петровское; 51°45' с.ш., 56°20' в.д.	2	23973, 23990
<i>M. broweri</i>	USA, Alaska, Brooks Range, vic. Anaktuvuk Pass; 68°10' с.ш., 152° з.д. ¹	1	24468 (JFJ974)
<i>M. caligata</i>	USA, Alaska, vic. Fairbanks; 65° с.ш., 145° з.д. ¹	2	24071 (2383), 24072 (2384)
<i>M. camtschatica camtschatica</i>	РФ, Камчатка, Милюковский р-н, долина р. Юртиная; 53° с.ш., 157°30' в.д. ²	3	23763, 23764, 24507
<i>M. c. doppelmayri</i>	РФ, Бурятия, Северобайкальский р-н, верховья р. Чаи; 55°30' с.ш., 109° в.д.	1	23901
<i>M. c. bungei</i>	РФ, Якутия, низовья р. Лены, Хараулахский хр. ³	2	23977, 23978
<i>M. caudata</i>	Казахстан, Джамбульская обл., Киргизский хр., окр. п. Мерке; 42°30' с.ш., 73° в.д. ⁴	2	23708, 23767
<i>M. flaviventris</i>	USA, Colorado, Gunnison Co., 7 mi. N of Crested Butte, along East River, 38°53' с.ш., 106°58' з.д. ¹	1	24073 (816)
<i>M. himalayana</i>	China, Qinghai Prov., Yushu Aut. Pref., Nangqen Co., Bei-zha Forestry Sta., Ba Qu (river); 31°45' с.ш., 96°30' В ¹	1	24076 (4478)
<i>M. kastschenkoi</i>	РФ, Алтайский край, Солтонский р-н, 15 км от с. Нижняя Ненинка, лев. бер. р. Шалап; 52°45' с.ш., 86°15' в.д.	1	24425
	РФ, Новосибирская обл., Маслянинский р-н, 6 км к Ю от Маслянино; 54°15' с.ш., 84°15' в.д.	3	24437, 24438, 24439
	РФ, Новосибирская обл., Мошковский р-н, 60 км к С-В от Новосибирска, прав. берег р. Порос; 55°23' с.ш., 83°28' в.д.	1	24428
	РФ, Новосибирская обл., Мошковский р-н, 75 км к С-В от Новосибирска, верховья р. Сарбоян, прав. берег; 55°18' с.ш., 83°55' в.д.	1	24405
<i>M. marmota</i>	Switzerland, Canton of Graubünden ⁵ ; 46°40' с.ш., 9°40' в.д.	4	24497, 24498, 24499, 24501
<i>M. menzbieri</i>	Узбекистан, Чаткальский хребет, п. Паркент, Чаткальский зап.; 41°30' с.ш., 70° в.д. ⁶	1	23863
<i>M. monax</i>	USA, North Carolina; 35°30' с.ш., 82°30' з.д. ¹	2	24074 (ASU16756), 24075 (3279)
<i>M. sibirica</i>	РФ, Бурятия, Селенгинский р-н, Тойон, 25 км от Гусиноозерска, оз. Гусиное; 51°05' с.ш., 106°30' в.д.	1	23906
	РФ, Читинская обл., Ононский р-н, участок Победа; 50°10' с.ш., 115°50' в.д.	2	23904, 23905
	Читинская обл., Ононский р-н, Даурский зап., берег оз. Бурун-Торей, 20 м от госграницы; 50° с.ш., 115°20' в.д.	1	23902

¹ Замороженные ткани получены из Лаборатории молекулярной систематики Смитсоновского института, Вашингтон.² Животные отловлены В.А. Токарским (ХНУ, Харьков).³ Фиксированные ткани предоставлены Г.Г. Боескоровым (Мировой музей мамонта, Якутск).⁴ Животные отловлены В.И. Ронкиным (ХНУ, Харьков).⁵ Замороженные ткани получены от Элизабет Харринг (Музей естественной истории, Вена).⁶ Животное отловлено Е.И. Жолнеровской (ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск).



шего связывания (NJ) совпадает и показана на рис. 2. Все образцы явно разделяются на две большие группы — евразийских и североамериканских видов с бутстрэп-поддержками 92% и 66% соответственно. Группа палеарктических сурков, так же как на MP и NJ деревьях, образует отдельный кластер и при дистанционном анализе UPGMA. Среди евразийских видов с высоким индексом бутстрэпа (ИБ — 88%) объединяются в одну группу близкие виды *M. bobak*, *M. kastschenkoi* и *M. baibacina*. При этом, внутри последнего, образцы, относящиеся к разным подвидам, образуют самостоятельные ветви. Среди других палеарктических видов сурков только *M. camtschatica* и *M. himalayana* образуют отдельный кластер. Низкая бутстрэп-поддержка объединения остальных видов делает их расположение на дереве неразрешенным. Отдельный кластер в группе североамериканских сурков образуют *M. caligata* и *M. flaviventris* (ИБ — 74%).

Генетические дистанции Нея и Ли (D_{NL}) между изученными видами представлены в табл. 2. Абсолютные значения D_{NL} , полученные по результатам интер-MIR-ПЦР, оказались ниже, чем при интер-B1-ПЦР. Генетические дистанции, рассчитанные при обработке объединенной матрицы, характеризуются промежуточными значениями. Для палеарктических сурков в целом характерны меньшие межвидовые отличия (D_{NL} 0.07–0.22) по сравнению с неарктическими (D_{NL} 0.18–0.29), что свидетельствует об их большей молодости. Генетические дистанции между евразийскими и американскими видами в целом больше, чем внутри каждой из этих групп (0.21–0.35). Средние внутривидовые дистанции рассчитывались только для выборок, объем которых превышал три особи. Наименьший уровень внутривидовой изменчивости выявлен у *M. kastschenkoi* (D_{NL} = 0.01, n = 6), а наибольший — у *M. sibirica* (D_{NL} = 0.08, n = 4).

Филогенетическая интерпретация результатов

Североамериканские сурки занимают базальное положение как на парсимониальных, так и на дистанционных деревьях (рис. 2). Древнейшими в этой группе являются *M. monax* и *M. broweri*, представляющие собой две наиболее удаленные ветви. Включение данных видов в неарктическую группу противоречит результатам, полученным на основании секвенирования гена *cyt b*, которые объединяют их с палеарктическими сурками [10, 12], но согласуются с результатами анализа черепно-зубных признаков методами геометрической морфометрии [3]. Согласно этим данным,

M. monax и *M. broweri* не объединяются с палеарктическими представителями *Marmota*, дистанцируясь как от них, так и от неарктических сурков. Положение *M. broweri* на филогенетическом дереве дискуссионно. На основании ряда морфологических и кариотипических признаков предполагалось его происхождение от *M. camtschatica* [28, 29]. В то же время экологические и поведенческие характеристики сближают аляскинского сурка с *M. caligata*, подвидом которого он считался до открытия его кариотипической специфичности [30, 31]. Наши данные поддерживают последнюю гипотезу, однозначно дистанцируя *M. broweri* от палеарктических сурков.

Палеарктические виды образуют единую монофилетическую группу. Низкая бутстрэп-поддержка и, как следствие, политомическая структура дерева обуславливают неопределенное положение наиболее морфологически дифференцированных видов *M. marmota*, *M. menzbieri*, *M. caudata* и *M. sibirica* (рис. 2). Возможно, это отражает процесс быстрого формообразования, при котором дивергирующие формы не успевали накопить в геноме достаточно синапоморфных признаков. В некоторой степени это же относится и к ветви *M. himalayana*/*M. camtschatica*, объединение которых указывает на близкое родство восточно-палеарктических видов. На деревьях, построенных по данным секвенирования *cyt b* [10, 12], восточно-палеарктические сурки *M. sibirica*, *M. himalayana* и *M. camtschatica* образуют единую кладу, порядок ветвления в которой варьирует в зависимости от объема исследуемой выборки и примененных методов статистической обработки. Наши данные не противоречат этому объединению, однако располагают эту группу базальнее, что указывает, видимо, на их более древнее формирование. Близость этих видов частично поддерживается палеонтологическими находками переходных форм между *sibirica* и *camtschatica* в среднем плиоцене Забайкалья [32]. Эти же три вида можно объединить и на основании анализа структуры звукового сигнала [33], при этом *M. sibirica* находится в основании группы.

Особого внимания заслуживают взаимоотношения *M. menzbieri* и *M. caudata*. По данным секвенирования гена *cyt b* генетические дистанции между этими видами несоизмеримо малы, по сравнению с их морфологической дифференцировкой, и соответствуют подвидовому уровню [10]. В то же время исследование дифференциации ядерных геномов сурков методом гель-электрофореза белков выявило их значительную удаленность друг от друга [6]. Для объяснения сложившейся картины была

Рис. 1. Интер-B1-dID-ПЦР фингерпринт геномной ДНК сурков. Номера дорожек соответствуют коллекционным номерам образцов (табл. 1). S. und. — *Spermophilus undulatus*. Разделение денатурированных ДНК-фрагментов проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной.



Рис. 2. Суммарная NJ-дендрограмма результатов интер-MIR- и интер-B1-dID-ПЦР рода *Marmota*. Для кластеров, достоверность которых выше 50%, указаны индексы бутстрэпа (% от 1000 реплик): над ветвями — в анализе по методу ближайшего связывания (NJ), под ветвями — парсимониального анализа (MP); кластеры, достоверность которых ниже 50%, показаны как неразрешенные. Вместе с видовой принадлежностью образцов указаны их коллекционные номера (табл. 1). *Spermophilus undulatus* использован как внешняя группа.

Таблица 2. Генетические дистанции Нея и Ли (D_{NL}) сурков по результатам интер-SINE-ПЦР: под диагональю — межвидовые по результатам суммарного анализа всех признаков; над диагональю — MIR/BI-dID признаков; на диагонали — внутривидовые для выборок объемом более трех особей; нижняя строка — между сурками и длиннохвостым сусликом

	<i>M. kastschenkoi</i>	<i>M. baibacina</i>	<i>M. bobak</i>	<i>M. marmota</i>	<i>M. menzbieri</i>	<i>M. caudata</i>	<i>M. himalayana</i>	<i>M. sibirica</i>	<i>M. camtschatica</i>	<i>M. caligata</i>	<i>M. flaviventris</i>	<i>M. monax</i>	<i>M. broweri</i>	<i>Marmota</i>
<i>M. kastschenkoi</i>	0.01	0.01/0.19	0.04/0.17	0.07/0.25	0.05/0.34	0.09/0.32	0.15/0.29	0.08/0.34	0.11/0.32	0.11/0.43	0.19/0.41	0.23/0.38	0.22/0.39	
<i>M. baibacina</i>	0.07	0.05	0.05/0.18	0.07/0.27	0.05/0.25	0.09/0.29	0.15/0.25	0.08/0.35	0.11/0.28	0.11/0.39	0.19/0.39	0.24/0.46	0.22/0.36	
<i>M. bobak</i>	0.09	0.10	0.05	0.09/0.30	0.07/0.30	0.10/0.27	0.17/0.30	0.10/0.35	0.14/0.29	0.15/0.43	0.23/0.41	0.25/0.45	0.24/0.39	
<i>M. marmota</i>	0.13	0.14	0.17	0.02	0.07/0.25	0.10/0.30	0.17/0.30	0.11/0.33	0.12/0.26	0.15/0.38	0.25/0.35	0.26/0.40	0.25/0.37	
<i>M. menzbieri</i>	0.14	0.12	0.15	0.13	—	0.06/0.20	0.14/0.18	0.08/0.26	0.11/0.23	0.12/0.37	0.20/0.34	0.22/0.46	0.19/0.36	
<i>M. caudata</i>	0.16	0.16	0.16	0.18	0.11	—	0.19/0.28	0.11/0.33	0.11/0.27	0.15/0.40	0.23/0.38	0.28/0.47	0.23/0.39	
<i>M. himalayana</i>	0.19	0.18	0.21	0.22	0.15	0.22	—	0.17/0.26	0.14/0.24	0.23/0.31	0.27/0.29	0.33/0.37	0.29/0.30	
<i>M. sibirica</i>	0.16	0.17	0.19	0.19	0.14	0.18	0.20	0.08	0.13/0.34	0.16/0.36	0.21/0.40	0.27/0.39	0.24/0.37	
<i>M. camtschatica</i>	0.18	0.17	0.19	0.17	0.15	0.17	0.17	0.20	0.04	0.17/0.37	0.24/0.36	0.29/0.46	0.26/0.29	
<i>M. caligata</i>	0.22	0.21	0.25	0.23	0.21	0.24	0.25	0.23	0.24	—	0.18/0.17	0.22/0.28	0.19/0.31	
<i>M. flaviventris</i>	0.27	0.26	0.30	0.29	0.25	0.29	0.28	0.28	0.28	0.18	—	0.27/0.32	0.29/0.29	
<i>M. monax</i>	0.28	0.32	0.32	0.31	0.31	0.34	0.34	0.31	0.35	0.24	0.29	—	0.23/0.40	
<i>M. broweri</i>	0.27	0.27	0.29	0.29	0.25	0.29	0.29	0.28	0.27	0.23	0.29	0.29	—	
<i>S. undulatus</i>	0.63	0.64	0.62	0.67	0.65	0.64	0.71	0.66	0.68	0.64	0.70	0.68	0.66	0.65

выдвинута гипотеза отдаленной гибридизации *M. menzbieri* и *M. caudata* в прошлом, следы которой и остались в митохондриальной ДНК [13]. Можно предположить, что формы *caudata* и *menzbieri* длительное время развивались независимо. Экспансия красных сурков, предшествовавшая позднеплейстоценовому оледенению, привела к тому, что ареалы этих двух видов стали семисимпатричны. В это время могла произойти их гибридизация с интрогрессией мтДНК *M. caudata* в геном *M. menzbieri*. Последующее расчленение ареалов этих сурков Памирским ледниковым щитом послужило причиной их дальнейшей независимой эволюции, за время которой в мтДНК накопились отличия, соответствующие подвидовым. Такая схема соответствует истории ареала *M. caudata*, реконструированной на основе анализа изменчивости звукового сигнала [34]. Данные настоящего исследования не противоречат этой точке зрения, так как генетические различия между красным сурком и сурком Мензбира соответствуют видовому уровню ($D_{NL} = 0.11$). Однако их сравнительно низкие значения (табл. 2) и объединение этих видов на дистанционном дереве заставляют рассматривать недавнюю дивергенцию и быстрое накопление морфологических различий как один из вариантов эволюции данных видов.

Наибольшую генетическую близость среди всех видов сурков проявляют *M. bobak*, *M. kastschenkoi* и *M. baibacina*, образующие единый кластер образцов с наименьшими генетическими дистанциями (рис. 2, табл. 2). Все виды в этом кластере образуют свои отдельные ветви. При этом среди образцов *M. baibacina* выделяются две особи с Тянь-Шаня, принадлежащие к подвиду *M.b. centralis*. Они образуют в видовой ветви базальный кластер, отличаясь от остальных сравнительно высокими генетическими дистанциями (средние для *centralis/baibacina* $D_{NL} = 0.16$; для *M.b. baibacina* $D_{NL} = 0.05$). Л.И. Галкина на основании строения *os penis*, краниометрических и ряда других признаков показала значительную обособленность серых сурков Тянь-Шаня от алтайской формы и наличие у первых признаков, сближающих их с байбаком [35]. О том же свидетельствуют и данные более позднего сравнительно-морфологического исследования дифференциации серых сурков по краниологическим признакам [36]. Наши данные не поддерживают эту точку зрения, однозначно объединяя форму *centralis* с серыми сурками. Одновременно мы можем предполагать, что и морфологические и генетические особенности серых сурков Тянь-Шаня сохраняют признаки переходной, предковой для группы *bobak*, формы. Эволюция в группе серых сурков в таком случае должна была идти по схеме *centralis>baibacina>kastschenkoi*. При этом дивергенция *kastschenkoi* от *baibacina* строго поддерживается кариологическими данными [14, 15].

Образцы *M. bobak* кластеризуются вне зависимости от их географического распространения и не проявляют явной тенденции к определенной внутривидовой дифференциации. Это может как отражать отсутствие реальной внутривидовой дифференциации и длительной исторической фрагментации ареала, так и являться результатом реакклиматизационных работ, активно проводившихся во второй половине XX в. [37, 38], в результате которых генофонд вида был значительно перемешан на большей части ареала.

Таксономические выводы

Результаты данной работы в целом не противоречат наиболее распространенным взглядам систематиков на таксономический объем рода *Marmota* [39, 40]. Исключение составляет *M. kastschenkoi*, видовая самостоятельность которого была нами обоснована ранее на основании кариотипических отличий [14]. В настоящем исследовании *M. kastschenkoi* проявляет свою видовую специфику, образуя отдельный кластер с высоким значением бутстрэп-поддержки (90%). Сравнительно низкие генетические дистанции, отделяющие эту форму от ближайших видов *M. bobak* и *M. baibacina* (0.09 и 0.07 соответственно), отражают характерные для хромосомного видообразования процессы, когда темпы эволюции кариотипа значительно опережают скорость молекулярных изменений генома [41, 42].

Ранее Л.И. Галкина на основании морфологических отличий предложила вывести *M.b. centralis* из состава *M. baibacina*, предлагая считать его подвидом *M. bobak* или придать ему видовой статус [35]. Мы не считаем правомочным вводить *centralis* в состав *M. bobak*, поскольку наши данные явно указывают на то, что данная форма относится к группе серых сурков, определенно дистанцируясь от байбака. В то же время, несмотря на явную дивергенцию двух подвидов *M. baibacina*, мы не считаем возможным признать видовую самостоятельность формы *centralis*, поскольку ни по одному из изученных морфологических и генетических признаков тянь-шанские серые сурки не имеют достаточно весомых видоспецифических отличий, как это имеет место в случае с *M. kastschenkoi*. Таксономическое значение выявленных различий этих явно близкородственных форм может быть отражено в придании серым суркам статуса надвида *M. baibacina*, в состав которого входят формы подвидового уровня с различной степенью дифференцировки и вид *in statu nascendi* *M. kastschenkoi*.

Наши данные также не поддерживают представления Г.Г. Боескорова с соавт. [43] о черношапочных сурках как о видах *in statu nascendi* и видовой самостоятельности *M.c. doppelmayri*, основанные на исследовании совокупности морфологических

и иммуногенетических признаков. На интер-SINE-деревьях образец формы *doppelmayri* помещается внутри клады *M.s. bungei* (рис. 2). Только представители подвида *M.s. camtschatica* образуют отдельный кластер и заметно отстоят от остальных черношапочных сурков. Как и в случае с серыми сурками, отсутствие определенного хиатуса хотя бы по одному диагностическому признаку и недостаточно высокий уровень генетической дифференциации подвидов *M. camtschatica* по яДНК являются препятствием для признания их видовой самостоятельности и придания черношапочным суркам ранга надвида, как предлагалось вышеуказанными авторами.

Деление исследованных видов сурков на неарктическую и палеарктическую группы по данным интер-SINE-ПЦР могло бы поддержать подродовую систематику рода *Marmota*, основанную на секвенировании гена цитохрома b и включающую выделение двух подродов [10], при условии отнесения *M. monax* и *M. broweri* к подроду *Petromarmota*, а не *Marmota*. Однако низкий уровень генетических различий по сравнению с данными по другим группам (например, дифференциация видов *Spermophilus* [6, 12]) заставляет нас придерживаться точки зрения И.М. Громова, который указывает на то, что эволюция видов рода *Marmota* не привела к его достаточно четкой подродовой дифференцировке [1].

Выделение видовых групп в составе рода нам представляется оправданным, так как это отражает существующие филогенетические отношения внутри рода. Критический анализ выделения групп видов в классификации, предложенной С. Степаном и др. [10], в приложении к нашим результатам подтверждает правомочность выделения группы bobak в составе *M. bobak* и *M. baibacina* с добавлением в нее *M. kastschenkoi*. Необходимо заметить, что образец *M. kastschenkoi* использовался в работе с цитохромом b в качестве подвида *M. baibacina*. Также наши данные не противоречат выделению группы camtschatica в предложенном объеме, т.е. *M. camtschatica*, *M. himalayana* и *M. sibirica*. В то же время выделение группы caudata представляется неоправданным, так как отражает близость входящих в нее *M. caudata* и *M. menzbieri* только по одному признаку, тогда как по другим признакам они достаточно далеки.

Авторы искренне благодарны коллегам, любезно предоставившим ткани и животных для данного исследования.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-04-00937, 08-04-00029) и подпрограммой “Динамика генофондов” Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Биоразнообразие и динамика генофондов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громов И.М., Бибииков Д.И., Калабухов Н.И. и др. Фауна СССР. Млекопитающие. Т. 3. Вып. 2. М.; Л.: Наука, 1965. 453 с.
2. Бибииков Д.И. Горные сурки Средней Азии и Казахстана. М.: Наука, 1967. 199 с.
3. Cardini A., O'Higgins P. Patterns of morphological evolution in *Marmota* (Rodentia, Sciuridae): geometric morphometrics of the cranium in the context of marmot phylogeny, ecology and conservation // Biol. J. Linn. Soc. 2004. V. 82. P. 385–407.
4. Никольский А.А. Звуковые сигналы млекопитающих в эволюционном процессе. М.: Наука, 1984. 199 с.
5. Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А. Хромосомные числа и видообразование у наземных беличьих (Sciuridae: Xerinae et Marmotinae) Голарктики // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1970. Т. 75. № 3. С. 112–126.
6. Межжерин С.В., Брандлер О.В., Ляпунова Е.А. и др. Генетические связи и дифференциация наземных беличьих Marmotinae Росоца, 1923 (Rodentia, Sciuridae) Палеарктики // Генетика. 1999. Т. 35. № 6. С. 756–764.
7. Жолнеровская Е.И., Бибииков Д.И., Ермолаев В.И. Иммуногенетический анализ систематических взаимоотношений сурков // Бюл. МОИП. Отд. биол. 1990. Т. 95. Вып. 5. С. 15–24.
8. Giboulet O., Ramousse R., Le Berre M. Evolution of life history traits and molecular phylogenies: sociality in ground dwelling squirrels as an example // Holarctic Marmots as a Factor of Biodiversity / Eds K.B. Armitage, V.Yu. Rumiantsev. Moscow: ABF P.H., 2002. P. 171–177.
9. Lyapunova E., Braun M., Albright D. et al. Phylogeny of the Holarctic genus *Marmota* based on studies of chromosomes and nucleotide sequences // Chromosome Research: Abstracts 12th Intern. chromosome conf. 1995. V. 3. Suppl. 1. P. 79.
10. Steppan S.J., Akhverdyan M.R., Lyapunova E.A. et al. Molecular phylogeny of the marmots (Rodentia: Sciuridae): tests of evolutionary and biogeographic hypotheses // Syst. Biol. 1999. V. 48. № 4. P. 715–734.
11. Kruckenhauser L., Pinsker W., Haring E. et al. Marmot phylogeny revisited: molecular evidence for a diphyletic origin of sociality // J. Zool. Syst. Evol. Research. 1999. V. 37. P. 49–56.
12. Herron M.D., Castoe T.A., Parkinson C.L. Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*) // Mol. Phylogenet. and Evol. 2004. V 31. P. 1015–1030.
13. Lyapunova E.A., Brandler O.V. Molecular-genetic study of remote hybridization in the genus *Marmota* (Sciuridae, Rodentia) // Evolution, genetics, ecology and biodiversity: Intern. conf. Abstracts. Vladivostok, 2001. P. 60.
14. Брандлер О.В. К видовой самостоятельности лесостепного сурка *Marmota kastschenkoi* (Rodentia, Sciuridae, Marmotinae) // Зоол. журн. 2003. Т. 82. Вып. 12. С. 1498–1505.

15. Brandler O.V., Lyapunova E.A., Boeskorov G.G. Comparative karyology of Palearctic marmots (*Marmota*, Sciuridae, Rodentia) // *Mammalia*. 2008. V. 72. P. 24–34.
16. Банникова А.А., Мамвеев В.А., Крамеров Д.А. Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 6. С. 853–864.
17. Bannikova A.A., Lavrenchenko L.A., Kramerov D.A. Phylogenetic relationships between Afrotropical and Palaearctic *Crociodura* species inferred from Inter-SINE-PCR // *Biochem. Systemat. and Ecol.* 2005. V. 33. P. 45–59.
18. Рябинина Н.Л., Банникова А.А., Шереметьева В.А. и др. Анализ ДНК высших приматов с помощью интер-SINE-ПЦР // *Генетика*. 2008. Т. 44. № 3. С. 315–322.
19. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press., 1989. 398 p.
20. Jurka J., Zietkiewicz E., Labuda D. Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 1. P. 170–175.
21. Васецкий Н.С., Гоголевская И.К., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. B1-dID – новый короткий ретропозон грызунов // *Молекуляр. биология*. 1999. Т. 33. № 3. С. 520–527.
22. Крамеров Д.А. Доказательство филогенетической близости семейств соневых и беличьих, основанное на изучении короткого ретропозона B1-dID // *Докл. Акад. наук*. 1999. Т. 364. С. 277–280.
23. Вениаминова Н.А., Гоголевский К.П., Васецкий Н.С., Крамеров Д.А. Сравнительный анализ числа копий коротких ретропозонов ID и B1 в геномах грызунов // *Молекуляр. биология*. 2007. Т. 41. № 6. С. 1081–1084.
24. Вениаминова Н.А., Васецкий Н.С., Лавренченко Л.А. и др. Реконструкция филогении отряда грызунов (Rodentia) по данным структурного анализа короткого ретропозона B1 // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 7. С. 916–929.
25. Swofford D.L. PAUP*. *Phylogenetic Analysis using parsimony (*and other methods)*, ver. 4. Sunderland MA: Sinauer Associates, 1998.
26. Van de Peer, De Wachter. TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees // *Cabios*. 1994. V. 9. № 2. P. 177–182.
27. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
28. Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А. Генетика и проблемы трансберингийских связей голарктических млекопитающих // *Берингия в Кайнозое: Материалы Всесоюз. симп. “Берингийская суша и ее значение для развития голарктических флор и фаун в кайнозое”* (Хабаровск, 10–15 мая 1973 г.). Владивосток, 1976. С. 337–353.
29. Hoffmann R.S., Koepl J.W., Nadler C.F. The relationships of the amphiberian marmots (Mammalia: Sciuridae) // *Oceas. Pap. Mus. Natur. Hist. Univ. Kans.* 1979. № 83. P. 1–56.
30. Rausch R.L., Rausch V.R. Cytogenetic evidence for the specific distinction of an Alaskan marmot, *Marmota broweri* Hall and Gilmore (Mammalia: Sciuridae) // *Chromosoma*. 1965. V. 16. P. 618–623.
31. Rausch R.L., Rausch V.R. The somatic chromosomes of some North American marmots (Sciuridae), with remarks on the relationships of *Marmota broweri* Hall and Gilmore // *Mammalia*. 1971. V. 35. № 1. P. 85–101.
32. Erbaeva M.A. History, evolutionary development and systematics of marmots (Rodentia, Sciuridae) in Transbaikalia // *Rus. J. Theriol.* 2003. V. 2. № 1. P. 33–42.
33. Никольский А.А., Формозов Н.А. Звуковой предупреждающий об опасности сигнал гималайского сурка (*Marmota himalayana*, Rodentia, Sciuridae) // *Зоол. журн.* 2005. Т. 84. № 12. С. 1497–1507.
34. Никольский А.А., Котляков В.М., Блюмштайн Д.Т. Оледенение как фактор географической изменчивости красного сурка (биоакустический анализ) // *Докл. Акад. наук*. 1999. Т. 368. № 6. С. 849–852.
35. Галкина Л.И. Оценка некоторых систематических особенностей сурков и географическая изменчивость горноазиатского сурка (*Marmota baibacina* Kastschenko, 1899) // *Фауна Сибири*. Новосибирск: Наука, 1970. С. 267–279.
36. Потапова Е.Г., Пузаченко А.Ю. Морфологическая дифференциация серого сурка (*Marmota baibacina*) и тарбагана (*M. sibirica*) в Южной Монголии // *Зоол. журн.* 1998. Т. 77. № 10. С. 1177–1190.
37. Дежкин А.В. Результаты искусственного расселения степного сурка в России // *Тез. докл. Междунар. V совещ. по суркам стран СНГ (21–23 сентября 1993 г., с. Гайдары, Украина)*. М., 1993. С. 8–9.
38. Токарский В.А. Анализ мероприятий по реакклиматизации степного сурка (*Marmota bobak* (Rodentia, Sciuridae)) на Украине // *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 2008. Т. 113. Вып. 2. С. 14–17.
39. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб., 1995. 522 с.
40. Wilson D.E., Reeder D.M. (eds). *Mammal Species of the World*. Johns Hopkins Univ. Press, 2005. 2142 p.
41. Воронцов Н.Н. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: Издат. Отдел УНЦ ДО МГУ, Прогресс-Традиция, АБФ, 1999. 640 с.
42. King M. *Species evolution: the role of chromosome change*. Cambridge: Univ. Press, 1993. 336 p.
43. Боескоров Г.Г., Жолнеровская Е.И., Воронцов Н.Н. и др. Внутривидовая дивергенция черношапочного сурка *Marmota camtschatica* (Sciuridae, Marmotinae) // *Зоол. журн.* 1999. Т. 78. № 7. С. 866–877.

Phylogeny and Systematics of Marmots Inferred from Inter-SINE PCR Data**O. V. Brandler^a, E. A. Lyapunova^a, A. A. Bannikova^b, and D. A. Kramerov^c**^a *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
e-mail: rusmarmot@yandex.ru*^b *Department of Vertebrate Zoology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*^c *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

Phylogenetic and taxonomic relationships in the genus *Marmota* were examined using inter-SINE PCR. The primers used were complementary to the consensus sequences of two short retroposons, MIR and B1-dID. The results suggest long-term genetic isolation of Nearctic and Palearctic marmots, but do not support subgeneric subdivision because of relatively low genetic differences between the marmot groups. Confirmation was received for the isolation of *bobak* and *camtschatica*, but not the *caudata* intrageneric species groups. Based on comparison of the mitochondrial and nuclear genome differences, the possibility of ancient hybridization between *M. menzbieri* and *M. caudata* was recognized. Species independence of *M. kastschenkoi* within the suggested superspecies of *M. baibacina* was supported.