

Молекулярни маркери, филогеография и търсене на критерии за разграничаване на видовете.

Наталия И.Абрамсон; Трудове на зоологическия институт, РАН, Приложение 1, 2009, с. 185-198

Наталия Абрамсон оглавява Лаборатория по молекулярна систематика към Зоологическия институт към Руската Академия на науките РАН в Санкт Петербург, Русия.

Превод: Димитра Лефтерова

описание. От края на миналия век описанието на видовото разнообразие явно се намира на гребена на „видонадробяващата“ вълна. Спецификата на настоящия етап на видоопределяне, респективно видонадробяване е в това, че: 1/ появява се нова фактология, ново разширение полето на при знаковото пространство – молекулярните маркери и тяхната универсалност и удобство на прилагане; 2/ появата на нова фактология довежда и до възникването на нова методология – филогенетичния анализ навлиза бързо на вътре видово ниво, възниква и бързо се развива ново направление на изследване – филогеография / Avise, 1987, 2000/.

Филогеографията на свой ред, много удобно ляга на оформящата се по-рано филогенетична концепция за вида / ФКВ/. ФКВ признава строго монофилетичните видове, а в качеството на ос-



Резюме:

Търсенето на универсален критерий за разграничаването на видовете никога не е спирало. Периодите на „видонадробяване“ и „видообединяване“, нееднократно се сменят, а споровете между привържениците на едната или другата тенденция продължават вече едно столетие. Махалото се движи ту на едната, ту на другата страна, в зависимост не толкова от доминиращата концепция за вида, но и от модата и от метода на

нова за тяхно разделяне често използва генните дървета, и това „дървесно мислене” ведно с широко развиващите се изследвания по филогеография, образуват „взривна” смес, която в крайна сметка води до увеличение на броя на видовете, практически във всички групи гръбначни животни. За разлика от които и да са морфологични признаци, които са специфични за всяка група организми, молекулярните признаци на пръв поглед притежават универсалност / има ги при всички и или при поразително болшинство организми/ и в това е тяхната особена привлекателност както за единна идентификационна система: ДНК баркода, така и за построяване на единно дърво на живота. При това генетичните дистанции задават универсална метрика на различията, приложима при всички групи и по такъв начин се открива прекрасната и дългоочаквана перспектива – систематиката получава универсален инструмент за определяне на видовете. Но за съжаление тази надежда за универсален критерий са пореден път се оказва лъжовен. В настоящата работа е показано, че проблемите, които възникват при работа с молекулярните маркери са същите тези, с които се сблъсква систематика, използвайки морфологични подходи. С други думи, използването на молекулярни маркери ни връща към стари и добре познати проблеми, болшинство от които нямат решение в момента и усещането, че биолозите най-накрая имат единица за измерване, подобно на точните науки, като цяло е измамно.

Търсенето на универсален критерий за разграничаване на видовете никога не е спирало. Въпреки, че много от признатите от болшинството систематици видове трудно се подават на определяне по традиционните морфологични признаци, главния въпрос на систематиката не е в това, как да се определи / идентифицира вида/, а как да се разграничи. Парадоксално е това, че биологичния вид е най- фундаменталното понятие в биологията и в същото време се отнася към „вечните проблеми”: няма единна концепция за вида, нито съответно единно определение за понятието *вид*. Броя на концепциите за вида, всяко със своите определения и критерии, неизменно расте и както точно отбелязва Мейдън / Mayden, 1997/, днес броя на концепциите за вида са не по- малко отколкото биолозите, които ги обсъждат. Периодите на „видонадробяване” и „видообединяване” при това нееднократно се заменят един с друг, а споровете между защитниците им продължават вече столетие. Махалото се люлее ту на едната, ту на другата страна, в зависимост не само от доминиращата концепция, но и от модата и от методите на описание. От края на миналия век описанието на видовото разнообразие явно се намира на гребена на „видонадробяващата” вълна. Освен очевидните конюктурни съображения, спецификата на настоящия етап на видонадробяване е също в това, че: 1/ появи се нова фактология, ново разширено поле на признаковото пространство - молекулярните маркери с тяхната универсалност и удобство на прилагане; 2/ появата на

нова фактология доведе до възникването на нова методология: филогенетичния анализ прониква на вътревидово ниво, възниква и бурно се развива ново направление на изследване – филогеография / Avise, 1987, 2000/, с много ясно изследователска програма, в основата на която лежи построяването на вътревидови генеалогии / дървета/. Филогеографията на свой ред, много удачно приляга на създалата се по – рано филогенетична концепция на вида /ФКВ/ (Cracraft, 1983, 1989), която в западните страни практически заменя биологичната (Maup, 1971, 1996).

ФКВ признава строго монофилетичните видове, а в качеството на основа за тяхното разделяне често се използват генни дървета, и такава „дървесно мислене” (Sites, Marshall 2004) в едно с широко развиващите се изследвания по филогеография образуват „взривна” смес, която в крайна сметка води до увеличение на броя на видовете, практически във всички групи гръбначни животни. Така, ако в повечето големи справки по систематика на птиците, видовете се оценяват примерно на 9000, то някои изследователи считат, че детайлна ревизия с използването на молекулярни методи трябва да увеличи този брой до 20 000. (Graham 1996, Zink 1996). Броя на видовете на бозайниците за период, изминал между две издания на списъка на видовете на фауната по света (Wilson&Reeder 1993, 2005) се увеличава от 4629 на 5416. Един от най-ярките примери – признаването в Европа вместо на един полиморфен вид чудски сиг *Coregonus*

lavaretus на 100 вида и повече от 50 вида риба голец (Kotellat 1997).

Молекулярни маркери

Много изследователи се отнасят към молекулярните маркери не просто като към нов признак, позволяващ да се уточнят въпроси и проблеми, нерешени в рамката на морфологичния анализ, а буквално като към панацея. Такова увлечение към молекулярните методи /молекулярните маркери/ в много отношения е изцяло оправдано. Вече е трудно да си представим бъдещо развитие на зоологията и ботаниката, без използването на молекулярни методи. Успехите както на молекулярната филогенетика, така и на филогеографията са свързани не само със стремителното развитие на ДНК – технологиите /ПВР - PCR, автоматичното секвениране/, но и с ясна изследователска програма, лекостта на формализиране на получените данни и разработените алгоритми за техния анализ. Още едно неоспоримо преимущество на молекулярните данни – сравнимост и възпроизводимост. Огромен напредък се явява създаването на международна база данни, както за нуклеотидните, така и за аминокиселинните последователности /<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . Към безспорните заслуги на молекулярната филогенетика следва да се отнесе широкото разпространение и популяризацията на филогенетичното мислене и новия тласък към дискусии за проблема на вида и видовете граници.

Само молекулярните маркери дават възможността да се проследи генеалогията на отделните семейства, популациите и т.н. В същото време морфологичния подход към определяне на вида, несъмнено има ред ограничения, и именно затова видовете, описани на основа на такъв традиционен, основан на морфологията подход, е било предложено да се наричат морфовидове (“morphospecies”) (Cain, 1954). Това в никакъв случай не означава, че морфовидовете не могат да бъдат валидни /„добри”/ видове, а се подчертава само, че морфовид – това е хипотеза, която трябва да бъде проверена с други подходи и данни.

Това е същевременно справедливо спрямо които и да са други подходи, но за разлика от които и да са морфологични признаци, специфични за всяка група организми, молекулярните признаци на пръв поглед притежават универсалност /има ги при всички и или при поразително болшинство организми/ и в това е тяхната особена привлекателност, както за единна идентификационна система: ДНК - баркода /използва се фрагмент от митохондриален ген: първата суб единица на цитохром оксидазата COI, подробности по долу/, както и за построяване на единно дърво на живота /използва се последователността на малката субединица рибозомална РНК - 18 S rRNA/. При това генетичните дистанции задават универсална метрика на различията, приложима при всички групи и по такъв начин се открива прекрасната и дългоочаквана перспектива – систематиката получа-

ва универсален инструмент за определяне на видовете и други систематични категории. Но за съжаление тази надежда за универсален критерий са пореден път се оказва лъжовна и аз ще се постарая да покажа, че проблемите, които възникват при работа с молекулярните маркери са същите тези, с които се сблъсква систематика, използвайки морфологични подходи. С други думи, използването на молекулярни маркери ни връща към стари и добре познати проблеми, болшинство от които нямат решение в момента и усещането, че биолозите най-накрая имат единица за измерване, подобно на точните науки, като цяло е измамно.

По-горе бе отбелязано, че сегашната вълна на „видонадробяване” е свързана с ново направление на изследванията - филогеографията и широкото използване на молекулярни маркери. Аз ще се постарая по натам да ви покажа основните причини за този взрив.

Филогеография

Това е много мощно и стройно изследователско направление. По-натам ще се спрем само на един аспект, свързан с това направление – проблема за определяне на видовете граници. Трябва веднага да се отбележи, че изказаните съображения не трябва да се разглеждат като критика на направлението като цяло: неговия очевиден напредък не предизвиква съмнения, но именно в плана на определяне на границите на вида и влиянието, което това направление е оказало на фи-

логенията и таксономията на видово равнище, съществуват много сериозни „подводни камъни“.

Установяването на направлението започва с програмната статия на Авайс (Avice et al. 1987), в която се въвежда и самия термин /филогеография/ и се оформят основните постулати. Сред най-важните постижения при формирането на филогеографията следва да се спомене, вече гореспоменатата статия, специалното издание на списание *Molecular Ecology* (1998, vol. 7, № 4), посветено на 10 – годишния юбилей на това направление с обзорни статии и накрая обемната монография „Филогеография. История и произход на видовете“ (Avice, 2000). За изминалите десетилетия десетки публикации в рамките на това направление, на различни таксони, се появяват в международните списания ежесечно и техният брой расте ежегодно в геометрична прогресия. В поразяващо мнозинство от тях, в качеството на молекулярни маркери се използват различни фрагменти митохондриална ДНК.

Една от очевидните причини на триумфалното шествие на филогеографията и нейната удивителна популярност, безусловно се явява отчетливо отработен и много логичен алгоритъм на изследване, който лесно може да се приложи за всяка група. Да го сравним с алгоритъма на изследване в рамките на традиционния анализ на вътревидовата изменчивост и таксономичната ревизия на който и да е широкоареален вид. Първа стъпка – събиране и отделяне на признаци за анализ – практически с нищо не се от-

личава. Във филогеографическото изследване, такъв макропризнак се явява нуклеотидната последователност на избрания молекулярен маркер / при гръбначните животни най-често се използва митохондриален ген – цитохром б, при безгръбначните – първата суб единица на цитохром оксидазата COI/, а отделните признаци – вариационните позиции /сайтове/ /замяна на нуклеотиди/.

След това, последователностите на отделните екземпляри се сравняват – този етап може да се сравни с определяне на позиционна хомология в морфологичните изследвания, и с помощта на различни програми и методи / на най-близкия съсед – neighbor joining, максимална парсимония – maximum parsimony, максимално правдоподобие – maximum likelihood, баесов анализ – Bayes analysis/ се построяват дървета. Ето тук е първото принципиално различие.

Искам да подчертая, че в класическите работи, дървото се явява графически резултат на представяне от изследователя на филогенията, крайния етап на изследването. Оценката на филогенетичния сигнал на морфологичните признаци се извършва по правило по-рано. Във филогеографското изследване, напротив, построяването на дърво по набора получени секвенции е начален етап на анализа и основа на всички други изводи /напомням за „дървесното мислене“/. На основа на топологията на полученото дърво се правят заключения за филогенията на разглежданата форма. Филогенията, на свой ред, винаги

предшества таксономичните изводи и тези данни служат за построяване на еволюционни сценарии и реконструкции на ландшафта и климата в миналото. Този алгоритъм има своите „подводни камъни“, както на стадий на построяване на самото дърво, така и на стадий негова интерпретация. Те представляват сами по себе си единен комплекс от проблеми и неотчитането на който и да е от тях, дава на изхода некоректен резултат. Въпреки, че много от отбелязаните по-долу „подводни камъни“, с лекота могат да бъдат преодоленни, количеството работи по филогеография, където това не е направено /включително и тези, в които се определят нови видове/ е достатъчно голямо, затова ще се спрем на най-значителните от тези „камъни“ по- подробно.

Сред „подводните камъни“ на стадий построяване на дърво, един от най – сериозните е избора на молекулярен маркер и то колко той може да повлияе на резултата. Адекватния избор на молекулярен маркер в съответствие с разглежданото таксономично ниво, представлява сам по себе си сериозен проблем, на който специално рядко се спират автори на молекулярно – филогенетични работи. Алгоритъма на филогенетичния анализ, независимо от качеството и количеството на данните, във всеки случай ще произведат каквото и да е дърво. Необходимостта от щателен подбор на признаци или групи признаци, адекватни на таксономичния статус на изучаваната група е добре известна на морфолозите. В морфологическите изследвания е

невъзможно използването на едни и същи признаци при разработка на филогения на таксони от различно ниво. В същото време в молекулярните изследвания, съществуват само няколко връзки, изхождайки от емпиричните данни за скоростта на изменението на едни или други маркери, съответстващи приблизително на родово, видово и друго ниво. На практика често един и същ маркер /все този цитохром б/ се използва за анализ на вътре видови връзки, за взаимоотношенията на видовете вътре в рода и на рода в триба, семейството. Като правило избора на молекулярен маркер се основава на някой общи данни за приблизителната скорост на неговата еволюция в други групи, на удобство на работа/ многокопийни ядрени гени, митохондриална ДНК/ и на достъпността на сравнителен материал в Генбанк.

Съвършено очевидно е, че за анализ на таксони със значително ниво на дивергенция /трибове, семейство/ е нужен по – малко изменчив маркер, в сравнение с този, който е необходим за сравнение на вътревидова изменчивост. Но при изучаване на групи на ниско таксономично ниво /вътревидова ревизия/ е нужен бързо еволюиращ маркер, но не достигащ предела на своето насищане. Опасността на използване на маркер с изключително бърза скорост на мутиране, който достига своето насищане на мутации е илюстрирано на рис.2. В този случай стойността на чифтовите различия между последователностите, разчитани по най – изменчивия сайт /транзиция в 3 - та позиция на кодона/, на 2

% ще съответства на много широк диапазон дистанция между сравняваните форми - от 15% практически до 50% , диапазона на различие става случаен. Много ярък пример за неотчитането на този фактор се явява използването на контролен регион митохондриална ДНК. Този фрагмент от митохондриалния геном е силно изменчив при относително неголямо количество информативни сайтове. Много добре се използва при популационно – генетически изследвания, при необходимостта за отличаване на отделни индивиди, демове или близки популации, при изучаване на историята на популациите в неголям регион, но той ще работи лошо на видово равнище, на широка географска скала. На това ниво може да се очаква случайна поява на завишени оценки на разстоянията.

Този маркер създава много висок шум на изменчивост, който се оказва неинформативен в плана на разделението на групите. Той много силно маскира реалните различия между групите. Именно дадения маркер, макар неголям негов фрагмент /237 ндв./, бил използван в работата, посветена на таксономичната ревизия на дългоухи прилепи (Spitzenberger et al. 2006). Не е удивително, че в резултат на такъв анализ, авторите повдигат в ранг практически всички подвидове да видово ниво и описват още три нови вида / 19 общо!/. При това по данни на същата тази работа, анализ на морфологичните различия, практически подкрепя разделението само на два вида. Степента на насищане на марке-

ра в тази работа е неоценена.

Как да изберем добър маркер, как да избегнем този „подводен камък“?

Условията на избора на адекватен маркер и идентифицирането на филогенетичния сигнал е зле разработен въпрос. В идеалния случай добрият маркер е длъжен да съдържа достатъчно количество информативни сайтове, да притежава ниско ниво на хомоплазия и относително равномерна скорост на еволюция в предела на изучаваната група, но във всеки случай за получаване на надежден резултат е желателно използването на няколко независимо еволюиращи маркери / например митохондриални и ядрени/. Въпреки това, различните маркери могат да бъдат взаимодопълнящи се, т.е могат да показват разклонения от различен порядък и при обединението им в общия масив данни да дават по-голямо количество информативни сайтове. При работа с нов маркер е необходимо да се проведе работа по тестването на неговата изменчивост и възможностите му да се използва като филогенетичен маркер, при възможност върху група с добре изследвана систематика и еволюционна история (Тарасов и др., 2008).

Други, най-много «остри подводни камъни» на пътя на построяването на дърво са свързани с малко количество изследвани екземпляри и неравномерността на обхвата на проби по ареала с недооценка на вътре видовата изменчивост. Работи по филогеография, в които се използват поразително малко проби и е обхваната неголяма част от видовия ареал, са достатъчно

много (Brunhoff et al. 2003; Fedorov et al. 1999) и те също водят към завишаване на броя на видовете таксони, често за сметка на това, че на топологията на дървото може да окаже влияние избора на външна група, моделите на замяна и метода на анализ. На тези въпроси е посветено значително количество специална литература и ние няма да се спираме на тях в дадената статия. На всеки подводен камък по пътя на получаване на дърво може да се натъкнете и тогава още отначало ще се получи неинтерпретивен резултат.

Струва си да се подчертае, че подводните камъни по пътя на построяване на молекулярните дървета, казани по-горе, носят методически /технически/ характер и е възможно да бъдат избегнати, но те са достатъчно често срещани в работите по филогеография и така водят до неоправдано видонадробяване.

Друг род подводни камъни се срещат на ниво интерпретация на молекулярните дървета и те могат да бъдат отведени към методологичните. Един от сериозните въпроси в дадения контекст е съответствието на полученото дърво, отразяващо възможната генеалогия на изучения признак на генеалогията на популациите или видовете. Както и описах по-горе, този проблем възниква не само в рамките на молекулярните изследвания. С подобна проблематика се сблъсква и морфолога при работа с единичен признак или отделни органи и превод на морфологически ред във филогенетически. Еволюцията на гените, отделни алели

и еволюцията на видовете и популациите, представена във вид на дървета, може да не съвпадат, не само по отношение на времето на дивергенция, но също така и в порядъка на разклонения. Дивергенцията на популацията, която в крайна сметка и интересува изследователя, почти винаги става по-късно отколкото дивергенцията на гените (Edwards, Beerli 2000, Nichols 2001).

Като правило, дивергенцията на гените предшества дивергенцията на популацията, което често води до съхранение на полиморфизма на предшественика и непълна сортировка генеалогични майчини /мтДНК/ линии при популации и видове с малко време на изолация (Avice, 2000), при видове изпитващи «взривна» еволюция /риби цихлиди и много видове полевки/. В такъв случай изследователя неизбежно се сблъсква с полифилия и парафилия на получените генни дървета. Полифилия, парафилия и взаимна /реципрочна/ монофилия, когато се говори за генеалогични линии мтДНК, описват състояние на популациите по отношение една на друга от момента на дивергенцията на тези линии в различно времево сечение. (Avice, 2000; Rosenberg N.A. 2003). Полифилия или парафилия – много разпространен случай при изследванията, основани на мтДНК на вътревидово и видово равнище. Това предизвиква преди всичко насрещни въпроси и недоумения от страна на изследователите, работещи на организмово равнище, от една страна, а от друга по праволинейна интерпре-

тация такива дървета водят също така до видонадробяване. Детайлен анализ на повече от 2000 филогеографски изследвания, базирани на изменчивостта на последователностите на мтДНК (Funk, Omland 2003), показва че работите, при които са идентифицирани полифилетични или парафилетични видове съставляват около 23%. Такъв висок процент идентифицирани полифилетични видове таксони сам по себе си трябва да предупреди изследователя и да го накара сериозно да се замисли за причините на това явление.

Друг проблем, влияещ на интерпретацията на дървета мтДНК във филогеографските изследвания и свързана с хибридизацията и интрогресията на мт геном с другия вид при обратното кръстосване. Естествено, че вследствие на това също ще има парафилия. За междувидова интрогресия може да указва наличието на хаплотипове на чуждия вид, именно в зоната на симпатрия, докато на голяма част от ареала видовете добре се различават и генетично и морфологично, и при изследване на алопатричната популация са взаимно монофилетични. В случаи на скорошна интрогресия, описването на такива случаи не е така трудно, особено когато видове с чужд мт геном се намират основно в зоната на симпатрия на двата вида.

Такъв случай на интрогресия е намерен от нас при изучаване на филогеографията на един от най-разпространените видове гризачи в горската зона – горската полевка. Хаплотиповете на рижите полевики от популацията

на северната европейска част на Русия и Урал се оказват по – близко до хаплотиповете на червената полевка, отколкото до хаплотиповете на своите себеподобни от южноевропейски и западноевропейски популации (Defontaine et al. 2005, 2006; Родченкова, Абрамсон 2007, Абрамсон и др. 2009). При разселване на европейската рижка полевка в постплейстоценския период на изток и едновременно разширение на ареала на червената полевка на запад е станал вторичен контакт на по-рано алопатричните видове и се сформира широка зона на симпатрия. Индивиди с интрогресивни хаплотипове в дадения случай са намерени само в зоната на симпатрия и по много тесния и край.

В дадения случай на интрогресия – много ясно явление, освен това намерихме и единични индивиди – хибриди първо поколение (Абрамсон и др, 2009). Доколкото времето след интрогресията нараства, тези варианти хаплотипове, които са се съхранили в популацията след интрогресията, в резултат на пресортировка на линиите, с голяма вероятност могат да заемат базално положение и могат вече да не проявяват никаква географска асоциация с популацията, от която произлизат. В този случай да се определи полифилия, вследствие на интрогресия, от непълно разделение на линиите и съхранение на предшествения полиморфизъм ще бъде много трудно, тъй като такива хаплотипове вече натрупват големи различия от линията на техния произход и могат да се намират далече зад границите на зоната

на симпатрия.

Но даже, ако полученото генно дърво, построено съобразно възможните подводни камъни, вече споменати, да остава много съществено, тогава главния въпрос в рамките на тази статия е: как да се преведе полученото дърво в таксономична схема? Винаги ли клонове, отделени по отделни гени, съответстват на самостоятелни видове или други таксони? Каква е дистанцията или мярката за различие и по какви гени се установява? С други думи, как да се интерпретира разделенията в генеалогическите линии, показани по нерекombиниращи маркери? Ние вече споменахме за неразривната връзка между «дървесното мислене», доминиращата днес филогенетична концепция на вида ФКВ и взривното увеличаване на броя на видовете, практически във всички таксони и то не за сметка на нови описания, а за сметка на придаване на много подвидове, видов статус / в теорията за ФКВ, място за подвидове няма/ и описание на „криптически видове” в хода на много филогеографски изследвания. Някои изследователи наричат това „таксономична инфлация” (Isaak et al, 2004), други предлагат въобще да се откажем от концепцията за вида (Hendry et al. 2000).

Защо резултатите от филогеографските изследвания, заедно с ФКВ, в качеството си на методологична основа, довеждат до умножаването на видовете таксони? Съгласно ФКВ, видът - това е „най – малката съвкупност от популации /бисексуални/ или /агамни/ видове, диагностируеми по уникални съче-

тания от признаци” (Wheeler, Platnick 2000), или « неразложим / irreducible/ клъстер организми, диагностично отличаващи се от други такива клъстери, вътре в които съществуват отношения на предци и потомци” (Cracraft, 1989). За да може това определение да работи е много желателен универсален инструмент на измерване, който би бил пригоден за всички биологични обекти. Съвършено очевидно е, че най – добрия претендент за ролята на такъв инструмент е генетичната дистанция, измерваема в процент разлика между двойките хомологни последователности ДНК (Ayala, 1975). Ако се отчете, че придържайки се към различни концепции на вида, експертите дават много различаващи се оценки на съвременното биоразнообразие (Peterson, Navaro – Siquenza, 1999), което на свой ред създава немалко трудности за ползвателите на таксономията / еколози, паразитолози, разработчици на пророзащитни мероприятия/, то идеята за разработване на универсален критерий за определяне на видовете граници изглежда примамливо. В идеалния случай, такъв критерий при това е длъжен да бъде независим от теоретичните разработки за видообразуването и концепциите за вида. Генетичните дистанции получават допълнителна поддръжка в качеството на претендент за ролята на такъв универсален критерий за определение на видовете граници след работите на Авайс и Джонс (Avisе, Johns 1999), от които следва, че митохондриалния ген за цитохром б (cyt b) при гръбначните еволюира приблизително с еднаква

скорост с 2% замени на сайт за 1 млн. години. След това, те са сравнили генетичните дистанции по сайт b между изолираните популации на един вид и между близки видове на един род. По техни данни, дивергенцията приблизително в 13% съответства на наблюдаваната между видовете, докато значително по – малки различия се наблюдават между филогрупи вътре във вида.

По такъв начин изглежда, че универсален критерий и универсален инструмент за определение на видовите граници е намерен. Но след натрупването на огромен фактически материал, става ясно, че един и същи ген / същия този сайт b/, еволюира с различна скорост даже при близки таксони. Различни гени дават много различни оценки на ниво генетична дивергенция по силата на различията в скоростите на молекулярната еволюция. Освен това се наблюдава и географска изменчивост в скоростта на еволюцията между близки групи.

Едно от най-сериозните възражения против използването на генетичната дивергенция за определение на видовите граници при различните таксони се състои в това, че продължителна изолация на близкородствените групи, индикатор на които служи тази величина, сама по себе си не се явява обезателно условие / а само предпоставка/ за образуване на нови видове (Ferguson 2002). Пример, илюстриращ казаното, може да послужи работата по филогеография на същинските леминги (*Lemmus*) (Fedorov et al., 1999, Fredga et al., 1999). Анализа на измен-

чивостта на последователностите сайт b при палеарктичните представители на рода показва, че най-големите различия се наблюдават не между признати и добре различаващи се видове, норвежките (*Lemmus lemmus*) и сибирските (*Lemmus sibiricus*) леминги, между които съществува и географска изолация, а между западните и източните популации на сибирския леминг с условна граница в района на делтата на река Лена. Било е предложено да се прекрои систематиката на лемингите в съответствие с тези дистанции (Fredga et al., 1999; Shenbrot, Krasnov 2005).

След проведения от нас анализ, който показва, че хаплотиповете на лемингите от делтата на река Лена, попадат в така наречената „западна” група (Abramson et al, 2008) и така както лемингите са разпространени без прекъсване по арктическата тундра и няма никакви прегради между популациите на западната и източната групи, то несъмнено при допълнителни изследвания ние да можем да намерим индивид с хаплотип от различен митохондриален клон. В този случай дълбочината на генетичната дивергенция по митохондриалния геном отразява минала изолация в плейстоценски рефугиуми и историята на постплейстоценското разселване, но не и образуване на нови видове. Значителна генетична диференциация може да се съхрани много дълго време и по никакъв начин да не маркира процес на видообразуване. Необходимо е да се различават генетичните процеси, въввлечени в процес на видообразуване от гене-

тичните характеристики, по които се различава двойка съвременни видове (Templeton, 1994).

Въпреки, че по-късно основоположника на филогеографията Дж. Авайс се отказа от идеите да се разграничават видовете на основа дистанцията по цитохром б, те биват продхванати от Бейкър и Брейдли (Baker and Bradley 2006). Авторите се връщат към генетичната концепция за вида (Bateson, 1909) и отново изтъкват генетичната дистанция в качеството на критерий за разделение на видове и фактически приравняват понятието вид /при бозайниците/ към понятието „филогрупи“. При това даже те са понижили прага на отделяне на видовете по цитохром б до ниво на различие 5%. Съгласно очакванията на тези автори при последователно прилагане на техния критерий, броя на видовете бозайници трябва да се увеличи с още 2000. Да напомним, че за изминалите 10 години между две издания на списъка на видовете бозайници в световната фауна (Wilson & Reeder 1993, 2005), техния брой вече се увеличава практически с 1000.

Следва да се отбележи още едно обстоятелство, свързано с приложението на ДНК технологията, бързото увеличаване на броя на видовете и откриването на многобройни криптични видове. Още в началото на 60 – те години систематичите започват да използват за описание и отделяне на видове не само морфологични признаци, но също така данни от кариологията, алозимен анализ, цитология, имунология, но те са се прилагали то не

много изследователи, на първо място защото тези методи изискват много висока експертност на изследователя и особен вид на събрания материал /тъканни култури или живи животни, тъкани, фиксирани по строго определен начин/ или отглеждане на лабораторна колония животни, което не винаги е достъпно за широкия кръг изследователи. В същото време, работата с ДНК – маркери не изисква нито едното, нито другото. Методиките се усвояват достатъчно бързо, за работа е подходящ фиксиран в спирт неголям участък от която и да е тъкан от животното, като този участък може да се съхранява дълго и изследователя може да пристъпи към работа по всяко време. Освен това е възможна работа с колекциониран материал, съхраняващ се в зоологическите музеи и е напълно основателно опасението, че в скоро бъдеще такова изместване на акцента в страна на молекулярните методи при изследване на биологичното разнообразие /конкретно при бозайниците/ ще доведе до това, че новото поколение изследователи ще имат много приблизителни знания по биология и диагностичните признаци на организмите, които изучават. Да се върнем към генетичната дистанция. Днес се известни вече достатъчно много примери, когато дистанцията между някои изолирани популации /филогрупи/ при гръбначните, значително превишават същата между двойки «добри» видове на ниво не на 5%, а на 13%. Крайно е наравномерна скоростта на еволюция на един и същ участък ДНК, даже при много близки видове.

В качеството на един такъв пример, може да приведем тясночерепната полевка (*Microtus gregalis*). При изследване на изменчивостта на цитохром б в изолираните популации на този вид ние се натъкнахме не само с крайно неравномерни темпове на изменчивост между отделните популации, но и изключително завишени темпове в сравнение с близките видове на този род. Генетичните дистанции между популациите на този вид превишават споменатите 13% и са повече не само при сестринските видове на рода, но превишават и дистанцията при този маркер при различни под родове рижи полевки (Abramson, Kostygov 2007).

Следвайки логиката на Бейкър и Брейдли, тук могат да се опишат 3 вида, а ако се отчете, че остават още няколко неизследвани географски изолирани популации, то и повече. От друга страна, дистанцията по ядрени маркери, дава съвсем други оценки. При използване на ядрен маркер, при тази топология на дървото, дистанциите стават напълно съразмерни с аналогични дистанции при други таксони от такъв ранг.

Доказателство за продължителна генетична изолация на популациите е недостатъчно за това, за да им се признае статуса на самостоятелни видове. Необходим е комплексен подход за разделяне на видовете и описание на видовото разнообразие, а границите между видовете трябва да се установяват с отчитане на данни от най – различни дисциплини, такива като сравнителна анатомия, филогеография,

популационна генетика, екология и етология (Dayrat 2005). В рамките на тези дисциплини вече съществува достатъчно широк асортимент методи за разграничения на видовете и само прилагайки ги съгласувано, може да се достигне до описание на видовото разнообразие. Алгоритъма на такъв анализ може да се състои от следните етапи: морфолозите извършват описание на морфологичното разнообразие, анализират изменчивостта на морфологичните признаци и поставят хипотеза за морфологичните видове /морфовидове/. На следващия етап, валидността на тези морфологични видове /или части от тях/ се тестват с помощта на други подходи и допълнителни данни /молекулярни, поведенчески, онтогенетични и др./. Доколкото, такива изследвания като време изискват голям разход на време и пари, практически при дейността си систематиките, логично първо изследват проблемни комплекси видове и то тези, които за добре отличими и леко диагностируеми морфологични видове. При това следва да подчертаем, че необходимостта да се тестват с други методи морфологичните видове, в никой случай не означава, че молекулярните методи, например, заменят морфологичните (Will and Rubinoff 2004). Широкото увлечение по прилагане на молекулярните маркери във филогенията и систематиката е разбираемо и създава усещане на огромен пробив в биологията въобще, както и в разглежданите дисциплини в частност, в това число и по отношение на такъв наболял въпрос, като определянето на

вида и установяване на неговите граници. Много често, когато се появява нов метод, ние го разглеждаме като панацея и той вълн от всякакво съмнение е много важен и много нужен, но не трябва да се използва една методология за решение на такъв проблем, какъвто е определянето на видовите граници. Доколкото сам проблема за вида, произтича от опита да се сведе в едно понятие таксономичните категории и еволюционните групи /с други думи, процес и резултат/, то неразрешимостта на проблема остава дотогава, докато не признаем, че отделените таксони, в своята основа са субективни (Неу, 2001) и ще продължаваме да търсим универсална концепция и универсален критерий, при които ще се стремим да обединим две различни съставлящи: единица за класификация и еволюционна група. Изхода от тази ситуация е в признаването на «таксономичен плурализъм» или в частност «видов плурализъм» (Dupre 1999, Павлинов 2005, 2007) и трактовката за вида като таксономична хипотеза, която може да бъде подложена на тестване с методите, описани по-горе. Така и днес са все още актуални изказванията на Чарлз Дарвин: „Няма непогрешим критерий, позволяващ да се различи вида и добре изразени разновидности... размерите на разлики, признати за необходими за извеждането на две форми във степен на видове, не се поддават на определение” /Дарвин, 1991/.

Няколко думи за идентификацията на видовете и дискусиата около „ДНК

баркод” (DNA – bar coding). В идеалния случай, определението на видовете трябва да бъде просто и ефективно, доколкото специалистите от различни области / фармаколози, физиолози, еколози, паразитолози и др., с други думи – ползватели на таксономията/, се нуждаят от точно определяне на вида. Именно около този проблем се разгоря гореща дискусия относно «ДНК баркодовете» (Herbert et al, 2003; Wheeler, 2005; Will and Rubinoff 2004 и др.), защитниците на тази идея (Herbert et al., 2003; Herbert et al., 2005) вярват, че може да се използва фрагмент от последователността на ДНК на един или няколко гени за видова идентификация, понеже всеки вид притежава свой набор от видовоспецифични позиции нуклеотидни бази. В тези случаи, когато е показано, че последователността от ДНК на конкретния молекулярен маркер, обезпечава по – бързо и надеждно определение на вида, отколкото морфологичните характеристики, няма основание това да се пренебрегва.

Могат да се приведат много примери от практиката за определяне на сивата полевка, където казаното е повече от справедливо, а за симпатричните видове двойници *Microtus arvalis* – *Microtus rossimeridionalis* – е най – надеждния и бърз метод. Морфологично да се диагностицират тези видове е невъзможно, но в случаи, когато морфологичните видови разлики са достатъчно ясни и обезпечат надеждно и бързо определение, няма смисъл да се отказваме от морфологията в полза на ДНК – баркода. Не си струва да се раз-

глеждат тези две системи на определяне като конкурентни и взаимноизключващи се. Избора на единия или другия способ на идентификация в конкретни случаи, ще зависи от конкретните обекти, така и от резултатите, но двете системи могат да се използват и паралелно. При това е необходимо да става ясно, че основаната на ДНК система на диагностика, може да бъде ефективна само в този случай, когато последователностите на молекулярния маркер, по който се определя, за всеки вид да са представени в база данни. Непълната база данни позволява на ползвателя само да определи колко дадената последователност се различава от останалите, вече предоставени в базата. Такъв резултат не позволява да се определи видовата принадлежност на екземпляра, при това няма автоматически да се указва, че даденият индивид е нов вид. Казаното, разбира се не

омаловажава инициативата по ДНК баркодиране, разработена от Института по биоразнообразие в Канада, а само подчертава, че на всеки етап / усилия по събиране на проби, първично определяне, поддържане на музейни колекции от екземпляри/ на създаване на централизирана система на определения, основани на ДНК маркери, силно ще зависи от експертната оценка на специалистите – систематичи от „класическата” школа.



сп. “Българска Наука”
www.nauka.bg

НАУЧИ ПОВЕЧЕ!