



УДК 57.06.592/599

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ, ФИЛОГЕОГРАФИЯ И ПОИСК КРИТЕРИЯ РАЗГРАНИЧЕНИЯ ВИДОВ

Н.И. Абрамсон

*Зоологический институт РАН, Университетская наб. 1, 199034 Санкт Петербург, Россия;
e-mail: Natalia_Abr@mail.ru*

Поиск универсального критерия для разграничения видов никогда не прекращался. Периоды «видодробительства» и «видообъединительства», при этом неоднократно сменяют друг друга, а споры между сторонниками той или иной тенденции ведутся по кругу уже не одно столетие. Маятник качается то в одну, то в другую сторону в зависимости не только от доминирующей концепции вида, но и от моды, и от методов описания. С конца прошлого века описание видового разнообразия явно находится на гребне «видодробительской волны». Специфика настоящего этапа видодробительства в том, что: 1) появилась новая фактология, новое расширенное поле признакового пространства – молекулярные маркеры с их универсальностью и удобством применения; 2) появление новой фактологии привело и к возникновению новой методологии – филогенетический анализ проникает на внутривидовой уровень, возникает и бурно развивается новое направление исследований – филогеография (Avice, 1987, 2000).

Филогеография, в свою очередь, очень удачно легла на оформившуюся ранее филогенетическую концепцию вида (ФКВ). ФКВ признает строго монофилитические виды, а в качестве основы для их выделения часто используются генные деревья, и такое «древесное мышление» вкупе с широко развернувшимися исследованиями по филогеографии образовали «взрывную» смесь, в итоге приведшую к увеличению числа видов практически во всех группах позвоночных. В отличие от любых морфологических признаков, которые специфичны для каждой группы организмов, молекулярные признаки на первый взгляд обладают универсальностью (есть у всех или у подавляющего большинства организмов) и в этом их особая привлекательность как для единой идентификационной системы: ДНК-штрихкод, так и для построения единого древа жизни. А генетические дистанции при этом задают универсальную метрику различий, приложимую ко всем группам, и, таким образом, открывается замечательная и долгожданная перспектива – систематики получают универсальный инструмент для выделения видов, но, к сожалению, это надежда на универсальный критерий в который раз оказалась ложной. В настоящем сообщении показано, что проблемы, которые возникают при работе с молекулярными маркерами очень сходны с теми, с которыми сталкивается систематик, используя морфологические подходы. Иными словами, использование молекулярных маркеров возвращает нас к давно и хорошо известным проблемам, большинство из которых не имеет на данный момент решения, и то ощущение, что наконец-то у биологов есть единица измерения, подобная точным наукам, весьма обманчиво.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, филогеография, критерий вида, генетические дистанции, ДНК-штрихкод

MOLECULAR MARKERS, PHYLOGEOGRAPHY AND SEARCH FOR THE CRITERIA FOR DELIMITING SPECIES

N.I. Abramson

*Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Emb. 1, 199034, St. Petersburg, Russia;
e-mail: Natalia_Abr@mail.ru*

The search for practical criteria for delimiting species was always topical. The waves of species splitting and lumping always altered depending both from dominant species concept, fashion and methods applied. Starting from the end of the last century the description of species diversity is at the peak of splitting wave. The specific feature of current splitting wave is that it relies 1) on new wide array of characters – molecular markers with their universality and easy application; 2) wide application of molecular markers in its turn gave birth to new methodology – phylogenetic analysis penetrates to intraspecies level, new direction of studies – phylogeography (Avice et al., 1987) appears and explosively develops. Phylogeography very successfully fall on phylogenetic species concept using gene trees as the basis for delimiting species and this «tree-thinking» approach together with widely expanding studies on phylogeography lead to dramatic increase in species number practically in all groups of vertebrates. Unlike morphological characters, molecular markers are universal (occur in all or almost in all organisms) and genetic distances, therewith, at a first glance gave an universal metrics for delimiting species which could be applied to almost all groups. Thus remarkable and long-awaited perspective opens- systematics receive an universal tool for distinguishing and delimitation of species. However, this hope on universal criteria once again appeared to be false and all issues which rise while working with molecular markers are very similar to those one have using morphological approach. In other words application of molecular markers bring us back to old and well known issues major part of which currently has no solution and the feeling that biologists at last have gain a unit similar to exact sciences is very wrong.

Key words: molecular markers, phylogeography, species criteria, genetic distances, DNA barcoding

Поиск универсального критерия для разграничения видов никогда не прекращался. Несмотря на то, что многие из признаваемых большинством систематиков видов с трудом поддаются определению по традиционным морфологическим признакам, главный вопрос систематики не в том, как определить (идентифицировать) виды, а как их разграничивать. Парадоксально то, что биологический вид – одно из самых фундаментальных понятий в биологии – в то же время относится к ее «вечным проблемам»: нет ни единой концепции вида, ни, соответственно, единого определения понятия *вид*. Число концепций вида, каждая со своим определением и критерием, неуклонно растет, и, как метко заметил Мэйден (Maiden 1997), сегодня число концепций вида не меньше, чем биологов, желающих их обсуждать. Периоды «видодробительства» и «видообъединительства» при этом неоднократно сменяют друг друга, а споры между сторонниками той или иной тенденции ведутся по кругу уже не одно столетие. Маятник

качается то в одну, то в другую сторону в зависимости не только от доминирующей концепции вида, но и от моды, и от методов описания.

С конца прошлого века описание видообразия явно находится на гребне «видодробительской волны». Помимо очевидных конъюнктурных соображений (Isaac, 2004, Harris & Froufe, 2005), специфика настоящего этапа видодробительства также в том, что: 1) появилась новая фактология – новое расширенное поле признакового пространства, молекулярные маркеры с их универсальностью и удобством применения; 2) появление новой фактологии привело и к возникновению новой методологии: филогенетический анализ проникает на внутривидовой уровень, возникает и бурно развивается новое направление исследований – *филогеография* (Avice 1987, 2000) с очень четкой исследовательской программой (см. обзор: Абрамсон 2007), в основе которой лежит построение внутривидовых генеалогий (деревьев). Филогеография, в свою очередь, очень удачно

легла на оформившуюся ранее филогенетическую концепцию вида (ФКВ) (Cracraft, 1983, 1989), которая в западных странах практически вытеснила биологическую (Майр 1971; Маур 1996).

ФКВ признает строго монофилитические виды, а в качестве основы для их выделения часто используются генные деревья, и такое «древесное мышление» (Sites, Marshall 2004) вкупе с широко развернувшимися исследованиями по филогеографии образовали «взрывную» смесь, в итоге приведшую к увеличению числа видов практически во всех группах позвоночных. Так, если в большинстве крупных сводок по систематике птиц число видов оценивалось примерно в 9000, то некоторые исследователи считают, что детальная ревизия с использованием молекулярных методов должна увеличить это число до 20000 (Graham 1996; Zink 1996). Число видов млекопитающих за период, прошедший между двумя изданиями списка видов мировой фауны (Wilson & Reeder 1993, 2005) увеличилось с 4629 до 5416. Один из наиболее ярких примеров – признание в Европе вместо одного полиморфного вида сига (*Coregonus lavaretus*) около 100 видов и более 50 видов гольцов (Kotellat 1997).

Молекулярные маркеры

Многие исследователи относятся к молекулярным маркерам не просто как к новым признакам, позволяющим уточнить вопросы и проблемы, не решенные в рамках морфологического анализа, но буквально как к панацее. Такое увлечение молекулярными методами (молекулярными маркерами) во многих отношениях весьма оправданно. Уже трудно представить дальнейшее развитие зоологии и ботаники без применения молекулярных методов. Успехи как молекулярной филогенетики, так и филогеографии связаны не только со стремительным развитием ДНК-технологий (ПЦР, автоматическое секвенирование), но и с четкой исследовательской программой, легкостью формализации получаемых данных и разработанными алгоритмами их анализа. Еще одно неоспоримое преимущество молекулярных данных – сравнимость и воспроизводимость. Огромным достижением является создание международной базы данных как по нуклеотидным, так и по аминокислотным последовательностям (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). К бесспорным заслугам моле-

кулярной филогенетики следует отнести широкое распространение и популяризацию филогенетического мышления и новый толчок к дискуссиям о проблеме вида и видовых границах.

Только молекулярные маркеры дают возможность проследить генеалогию отдельных семей, популяций и т.д. В то же время морфологический подход к выделению видов, несомненно, имеет ряд ограничений, и именно потому виды, описанные на основе такого традиционного, основанного на морфологии подхода, было предложено называть *морфовидами* («morphospecies») (Cain, 1954). Это ни в коем мере не означает, что морфовиды не могут быть валидными («хорошими») видами, но подчеркивает только, что морфовид – это гипотеза, которая должна быть проверена другими подходами и данными.

Это в той же мере справедливо и относительно любых других подходов, но в отличие от любых морфологических признаков, которые специфичны для каждой группы организмов, молекулярные признаки на первый взгляд обладают универсальностью (есть у всех или у подавляющего большинства организмов), и в этом их особая привлекательность как для единой идентификационной системы: ДНК-штрихкода (используется фрагмент митохондриального гена: первой субъединицы цитохром оксидазы – COI, *подробнее см. ниже*), так и для построения единого древа жизни (используется последовательность малой субъединицы рибосомальной РНК-18S rRNA). А генетические дистанции при этом задают универсальную метрику различий, приложимую ко всем группам, и, таким образом, открывается замечательная и долгожданная перспектива – систематики получают универсальный инструмент для выделения видов и других систематических категорий.

Но, к сожалению, это надежда на универсальный критерий в который раз оказалась ложной, и я постараюсь показать, что проблемы, которые возникают при работе с молекулярными маркерами, очень сходны с теми, с которыми сталкивается систематик, используя морфологические подходы. Иными словами, использование молекулярных маркеров возвращает нас к давно и хорошо известным проблемам, большинство из которых не имеет на данный момент решения, и ощущение, что, наконец-то, у биологов есть единица измерения, подобная точным наукам, весьма обманчиво.

Выше уже отмечено, что нынешняя волна «видодробительства» связана с новым направлением исследований – филогеографией и широким использованием молекулярных маркеров. Я постараюсь далее показать основные причины этого взрыва.

Филогеография

Это – очень мощное и стройное направление исследований. Далее мы остановимся лишь на одном аспекте, связанном с этим направлением, – проблеме определения видовых границ. Следует сразу отметить, что высказанные соображения нельзя рассматривать как критику направления в целом: его очевидные достижения не вызывают сомнения, но именно в плане определения видовых границ и влияния, которое это направление оказало на филогению и таксономию на видовом уровне, существуют очень серьезные «подводные камни».

Становление направления началось с программной статьи Авайса (Avice et al. 1987), в которой вводится и сам термин (*филогеография*) и оформляются основные постулаты. Среди важнейших вех в становлении филогеографии следует отметить уже упоминавшуюся статью, специальный выпуск журнала «Molecular Ecology», (1998, vol. 7, No. 4), посвященный 10-летию юбилею направления с обзорными статьями, и, наконец, объемную монографию «Филогеография. История и происхождение видов» (Avice 2000). За прошедшие десятилетия десятки публикаций в рамках этого направления по самым разным таксонам появляются в международных журналах ежемесячно, и их число растет ежегодно в геометрической прогрессии. В подавляющем большинстве их в качестве молекулярных маркеров используются различные фрагменты митохондриальной ДНК.

Одной из очевидных причин триумфального шествия филогеографии, ее удивительной популярности, безусловно, является четко отработанный и очень логичный алгоритм исследования, который очень легко применить к любой группе (рис. 1). Сравним его с алгоритмом исследования в рамках традиционного анализа внутривидовой изменчивости и таксономической ревизии любого широкоареального вида. Первый шаг – сбор и выделение признаков для анализа – практически ничем не отличается. В филогеографическом

исследовании таким макропризнаком является нуклеотидная последовательность выбранного молекулярного маркера (у позвоночных наиболее часто используется митохондриальный ген – цитохром *b*, у беспозвоночных – первая субъединица цитохром оксидазы – COI), а отдельными признаками – вариабельные позиции (сайты) (замены нуклеотидов).

Далее последовательности от отдельных экземпляров выравниваются – этот этап можно сравнить с определением позиционной гомологии в морфологическом исследовании, и с помощью различных программ и методов (ближайшего соседа – neighbour joining, максимальной парсимонии – maximum parsimony, максимального правдоподобия – maximum likelihood, байесов анализ – Bayes analysis) проводится построение деревьев. Вот тут и заключается первое принципиальное отличие.

Я хочу подчеркнуть, что в классических работах дерево является графическим результатом представлений исследователя на филогению, конечным этапом исследования. Оценка филогенетического сигнала морфологических признаков проводится как правило, ранее. В филогеографическом исследовании, напротив, построение дерева по набору полученных сиквенсов – начальный этап анализа и основа для всех остальных выводов (напомним, «древесное мышление»). На основе топологии полученного дерева делаются заключения о филогении рассматриваемых форм. Филогения, в свою очередь, всегда предшествует таксономическим выводам, и эти же данные служат для построения эволюционных сценариев и реконструкций ландшафтов и климата прошлого. В этом алгоритме есть свои «подводные камни» как на стадии построения самого дерева, так и на стадии его интерпретации. Они представляют собой единый комплекс проблем, и недоучет любого из них даст на выходе некорректный результат. И, несмотря на то, что многие из отмеченных ниже «подводных камней» легко обойти, количество работ по филогеографии, где этого не сделано (в том числе и те, в которых выделяются новые виды), достаточно велико, поэтому остановимся на самых значительных из «камней» поподробнее.

Среди «подводных камней» на стадии построения дерева один из самых серьезных – это выбор молекулярного маркера и то, насколько он повлияет на результат. Адекватный выбор

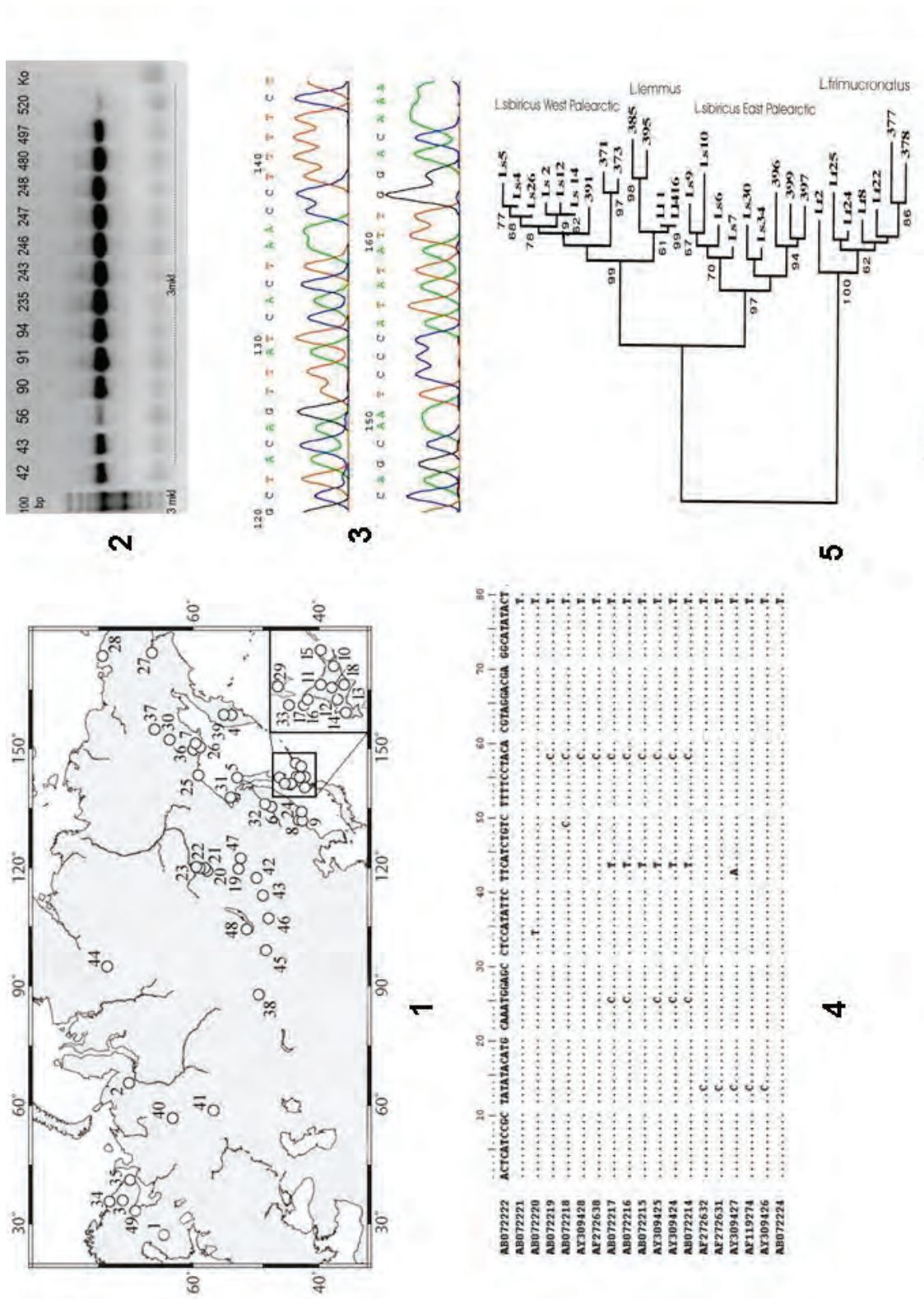


Рис. 1. Алгоритм типичного исследования по филогеографии: 1 – сбор материала для молекулярного анализа; 2 – амплификация молекулярного маркера (любой участок митохондриальной или ядерной ДНК); 3 – получение нуклеотидной последовательности на автоматическом секвенаторе (сиквенсов); 4 – выравнивание (точками обозначены идентичные нуклеотидные основания-сайты); 5 – построение дерева.

молекулярного маркера в соответствии с рассматриваемым таксономическим уровнем представляет собой очень серьезную проблему, на которой редко специально останавливаются авторы молекулярно-филогенетических работ. Алгоритмы филогенетического анализа, вне зависимости от качества и количества данных, в любом случае воспроизведут какие-либо деревья. Необходимость тщательного подбора признака или группы признаков, адекватных таксономическому статусу изучаемой группы, хорошо известна морфологам. В морфологических исследованиях невозможно использование одних и тех же признаков при разработке филогении таксонов разного уровня.

В то же время в молекулярных исследованиях существуют лишь некоторые ссылки, исходя из эмпирических данных на скорости изменения тех или иных маркеров, соответствующих приблизительно видовому, родовому и другим уровням. На практике чаще всего один и тот же маркер (все тот же *сyt b*) используется и для анализа внутривидовых связей, и для взаимоотношений видов внутри рода и родов внутри триб и семейств. Как правило, выбор молекулярного маркера основывается на некоторых общих данных о приблизительной скорости его эволюции в других группах, на удобстве работы (многокопийные ядерные гены, митохондриальная ДНК), на доступности сравнительного материала в Генбанке.

Совершенно очевидно, что для анализа таксонов со значительным уровнем дивергенции (трибы, семейства) нужен менее изменчивый маркер по сравнению с тем, который потребуется для изучения внутривидовой изменчивости. Но при изучении группы на низком таксономическом уровне (внутривидовой ревизии) нужен маркер быстро эволюционирующий, но не достигающий предела своего насыщения. Опасность использования маркера с чрезвычайно быстрой скоростью мутирования, который достиг своего насыщения мутациями, иллюстрирует рис. 2. В данном случае значению попарных различий между последовательностями, рассчитанному по самым изменчивым сайтам (транзициям в третьей позиции кодона), в 2% будет соответствовать очень широкий диапазон дистанций между сравниваемыми формами – от 15% практически до 50%. Диапазон различий становится случайным.

Очень ярким примером недоучета этого фактора является использование контрольного

региона митохондриальной ДНК. Этот фрагмент митохондриального генома очень изменчив при относительно небольшом количестве информативных сайтов. Его очень хорошо использовать в популяционно-генетических исследованиях при необходимости различения отдельных особей, демов или близких популяций, при изучении истории популяций в небольшом регионе, но он будет уже плохо работать на видовом уровне, на широкой географической шкале. На этом уровне можно ожидать случайного появления завышенных оценок расстояний.

Этот маркер создает очень высокий шум изменчивости, который оказывается неинформативным в плане разделения групп. Он очень сильно маскирует реальные различия между группами. Именно данный маркер, причем очень небольшой его фрагмент (237 пн), был использован в работе, посвященной таксономической ревизии ушанов (Spitzenberger et al. 2006). Неудивительно, что в результате такого анализа авторы поднимают ранг практически всех известных подвидов до видового уровня и описывают еще три новых вида (19 в итоге!). При этом по данным той же работы анализ морфологических различий подкрепляет выделение только 2-х видов. Степень насыщения маркера при этом в работе не оценена.

Как выбрать хороший маркер, как обойти этот «подводный камень»?

Условия выбора адекватного маркера, выявления его филогенетического сигнала – плохо разработанный вопрос. В идеале хороший маркер должен содержать достаточное количество информативных сайтов, обладать низким уровнем гомоплазии и относительно равномерной скоростью эволюции в пределах изучаемой группы, но во всех случаях для получения надежного результата желательно использование нескольких независимо эволюционирующих маркеров (например, митохондриальных и ядерных). Кроме того, разные маркеры могут быть взаимодополняющими, т.е. могут выявлять ветвления разного порядка и при объединении их в общий массив данных давать большее количество информативных сайтов. При работе с новым маркером необходимо провести тестирование степени его изменчивости и возможности использования его как филогенетического маркера по возможности на группе с хорошо исследованной систематикой и эволюционной историей (Тарасов и др. 2008).

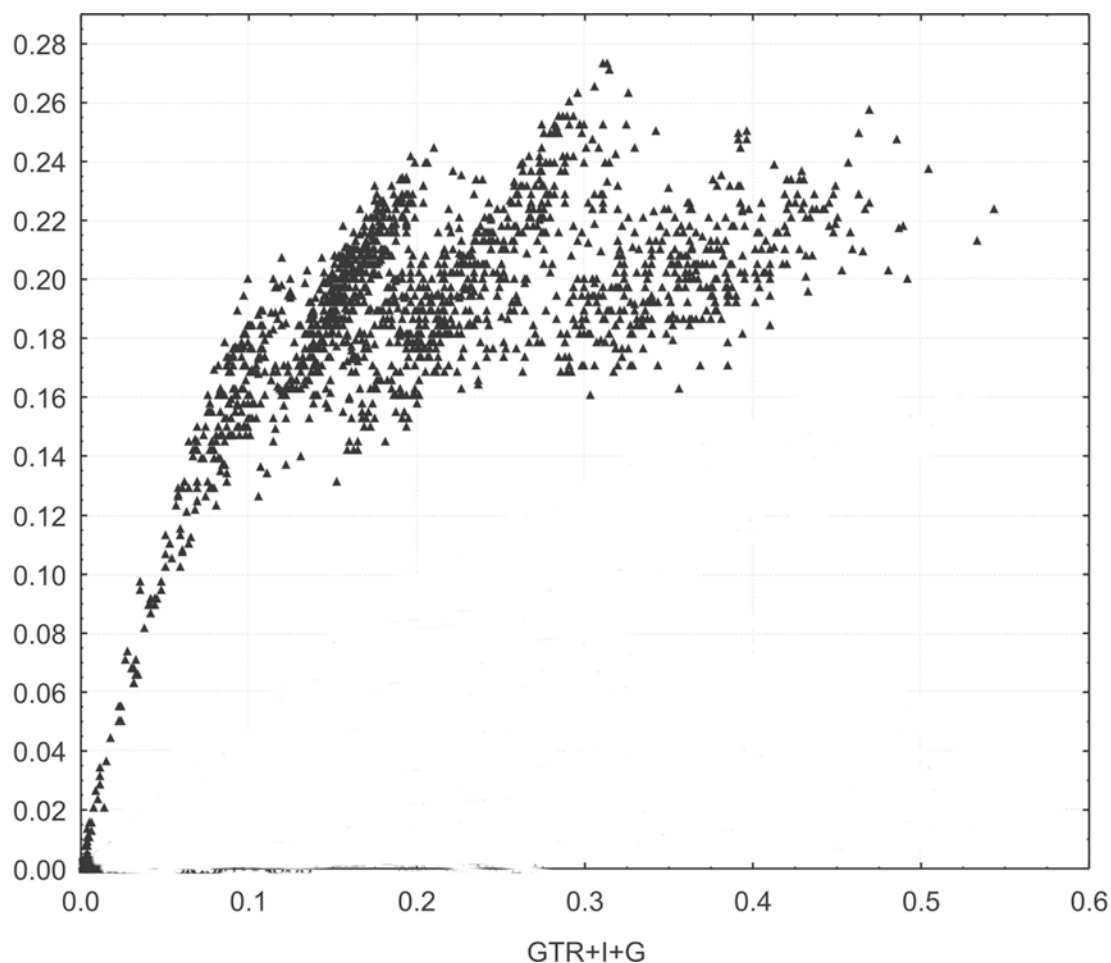


Рис. 2. График, иллюстрирующий мутационное насыщение. По *оси ординат* отложена попарная частота транзиций в третьей позиции кодона (в данном случае данные для *сут b* у полеvoчьих), по *оси абсцисс* – генетические дистанции между видами, рассчитанные по методу максимального правдоподобия.

Другие, наиболее «острые подводные камни» на пути построения дерева связаны с малым количеством исследованных экземпляров и неравномерностью охвата выборок по ареалу с недооценкой внутривидовой изменчивости. Работ по филогеографии, в которых используются поразительно малые выборки и охвачена небольшая часть видового ареала, достаточно много (Brunhoff et al. 2003; Fedorov et al. 1999), и они также приводят к завышенному числу видовых таксонов часто за счет того, что индивидуальная изменчивость принимается за видовую. Эти случаи мы подробнее разбирали ранее (Абрамсон 2007). Безусловно, на топологию дерева может оказать влияние и выбор внешней группы, и модели замен, и метод анализа. Эти вопросам посвящено значительное

количество специальной литературы, и мы не будем останавливаться на этих вопросах в данном сообщении. На любой из подводных камней на пути получения дерева можно напороться, и тогда мы уже вначале исследования получим не интерпретируемый результат.

Стоит подчеркнуть, что подводные камни на пути построения молекулярных деревьев, приведенные выше, носят методический (технический) характер, и их можно обойти, но они достаточно часто встречаются в работах по филогеографии и в итоге приводят к неоправданному видодробительству.

Другого рода подводные камни встречаются на уровне интерпретаций молекулярных деревьев и их можно отнести к методологическим. Один

из серьезных вопросов в данном контексте – это соответствие полученного дерева, отражающего возможную генеалогию изученного признака, генеалогии популяций или видов. Как и описанные выше, эта проблема возникла не только в рамках молекулярных исследований. С подобной проблематикой сталкивается и морфолог при работе с единичными признаками или отдельными органами и переводе морфологического ряда в филогенетический. Эволюция генов, отдельных аллелей и эволюция видов и популяций, представленная в виде деревьев, может не совпадать не только в отношении времени дивергенции, но также и в порядке ветвления. Дивергенция популяций, которая в конечном счете и интересует исследователя, почти всегда происходит позднее, чем дивергенция генов (Edwards, Beerli 2000; Nichols 2001).

Как правило, дивергенция генов предшествует дивергенции популяций, что часто приводит к сохранению предкового полиморфизма и неполной сортировке генеалогических материнских (мтДНК) линий у популяций и видов с относительно небольшим временем изоляции (Avice 2000), у видов, испытавших «взрывную» эволюцию (цихлидовые рыбы, многие виды полевоцых). В таких случаях исследователь неизбежно сталкивается с полифилией или парафилией на получаемых генных деревьях. Полифилия, парафилия и взаимная (реципрокная) монофилия, когда речь идет о генеалогических линиях мтДНК, описывают состояние популяций по отношению друг к другу с момента дивергенции этих линий на разных временных срезах (Avice 2000; Rosenberg N.A. 2003). Полифилия или парафилия – очень распространенный случай в исследованиях, основанных на мт ДНК на внутривидовом и видовом уровне. Это вызывает более всего встречающихся вопросов и недоумения со стороны исследователей, работающих на организменном уровне, с одной стороны, а с другой, при прямолинейной интерпретации таких деревьев также приводит к видодробительству. Детальный анализ более 2000 филогеографических исследований, базирующихся на изменчивости последовательностей митохондриальных генов (Funk, Omland 2003), показал, что работы, в которых выявлены так называемые *полифилетические* и *парафилетические* виды, составляют около 23%. Такой высокий процент выявленных полифилетических видовых таксонов уже сам по

себе должен насторожить исследователей и заставить серьезно задуматься о возможных причинах явления. В то же время при интерпретации данных молекулярной изменчивости исследователи часто поддаются искушению принять прямолинейную «ad hoc» гипотезу и не рассматривать возможные альтернативы.

Другая проблема, влияющая на интерпретации деревьев мтДНК в филогеографических исследованиях, связана с гибридизацией и интрогрессией мт генома другого вида при возвратных скрещиваниях. Естественно, что следствием этого также будет парафилия. На межвидовую интрогрессию может указывать нахождение гаплотипов чужого вида именно в зоне симпатрии, в то время как на большей части ареала виды хорошо различаются и генетически, и морфологически, и при исследовании аллопатрических популяций взаимно монофилитичны. В случае относительно недавней интрогрессии выявить такие случаи не так трудно, к тому же если особи с чужим мт геномом обнаруживаются в основном в зоне симпатрии двух видов.

Такой случай интрогрессии обнаружен нами при изучении филогеографии одних из самых распространенных грызунов лесной зоны – лесных полевок. Гаплотипы рыжих полевок из популяций севера европейской части России и Урала оказались ближе к гаплотипам красной полевки, чем к гаплотипам особей своего вида из южно-европейских и западноевропейских популяций (Defontaine et al. 2005, 2006; Родченкова, Абрамсон 2007, Абрамсон и др. 2009). При расселении европейской рыжей полевки в постплейстоценовый период на восток и одновременного расширения ареала красной полевки на запад произошел вторичный контакт ранее аллопатрических видов, и сформировалась широкая зона симпатрии. Особи с интрогрессированным гаплотипом в данном случае найдены только в зоне симпатрии и причем по очень узкому ее краю.

В данном случае интрогрессия – очень четкое явление, кроме того нами были найдены и единичные особи – гибриды первого поколения (Абрамсон и др. 2009). По мере того, как время после интрогрессии возрастает, те варианты гаплотипов, которые сохранились в популяции после интрогрессии, в результате пересортировки линий с большей вероятностью займут базальное положение и могут уже не проявлять никакой

географической ассоциации с популяцией, от которой они происходят. В этом случае отличить полифилию вследствие интрогрессии от неполного расхождения линий и сохранения предкового полиморфизма будет очень трудно, т.к. такие гаплотипы уже накопят больше отличий от линий их происхождения и могут находиться уже далеко за пределами зоны симпатрии.

Но даже если полученное генное дерево построено с учетом возможных подводных камней, упомянутых выше, остается очень существенный, пожалуй, главный вопрос в рамках данного сообщения: как перевести полученное дерево в таксономическую схему? Всегда ли клады, выделенные по отдельным генам, соответствуют самостоятельным видам или другим таксонам? Какова должна быть дистанция или мера различий и по каким генам их устанавливать? Иными словами, как интерпретировать разрывы в генеалогических линиях, выявленных по нерекombинирующим маркерам? Мы уже упоминали о неразрывной связи «древесного мышления» и доминирующей сегодня филогенетической концепции вида (ФКВ) и взрывном увеличении числа видов практически во всех таксонах, причем не за счет новых описаний, а за счет придания многим подвидам видового статуса (в теории ФКВ – подвидам нет места) и описания «криптических видов» в ходе многих филогеографических исследований. Некоторые исследователи назвали это «таксономической инфляцией» (Isaac et al. 2004), другие предложили вообще отказаться от концепции вида (Hendry et al. 2000).

Почему же результаты филогеографических исследований вместе с ФКВ в качестве методологической основы привели к умножению видовых таксонов? Согласно ФКВ вид – это «*наименьшая совокупность популяций (бисексуальных) или (агамных) видов, диагностируемых по уникальному сочетанию признаков*» (Wheeler, Platnick 2000, P. 58), или «*неразложимый (irreducible) кластер организмов, диагностически отличный от других таких кластеров, внутри которого существуют отношения предков и потомков*» (Cracraft 1989, P. 34–35) Для того чтобы это определение работало, очень желателен универсальный инструмент измерения, который был бы пригоден для всех биологических объектов. Совершенно очевидно, что лучший претендент на роль такого инструмента – генетическая дистанция, измеряемая в

процентах различия между парами гомологичных последовательностей ДНК (Ayala 1975). Если учесть, что придерживаясь разных концепций вида эксперты дают очень различающиеся оценки современного биоразнообразия (Peterson, Navarro-Siquenza 1999), что, в свою очередь, создает немалые трудности для пользователей таксономии (экологов, паразитологов, разработчиков природоохранных мероприятий), то идея разработки универсального критерия для определения видовых границ выглядит особенно заманчиво. В идеале такой критерий при этом должен быть независим от теоретических посылок о процессах видообразования и концепций вида.

Генетические дистанции получили дополнительную поддержку в качестве претендента на роль такого универсального критерия для определения видовых границ после работы Авайса и Джонса (Avice, Johns 1999), из которой следовало, что митохондриальный ген цитохром *b* (*cyt b*) у позвоночных эволюционирует приблизительно с равной скоростью в 2% замен на сайт за 1 млн лет. Далее они сравнили генетические дистанции по *cyt b* между изолированными популяциями одного вида и между близкими видами одного рода. По их данным дивергенция приблизительно в 13% соответствовала наблюдаемой между видами, тогда как значительно меньшие различия наблюдались между филогруппами внутри вида. Таким образом, казалось, что найден и универсальный критерий, и универсальный инструмент для определения видовых границ. Однако по мере накопления огромного фактического материала стало ясно, что один и тот же ген (к примеру, тот же *cyt b*) эволюционирует с разной скоростью даже у близких таксонов. Разные гены дают очень различные оценки уровня генетической дивергенции в силу различий в скоростях молекулярной эволюции. Кроме того, наблюдается и географическая изменчивость в скорости эволюции между близкими группами.

Одно из наиболее серьезных возражений против использования генетической дивергенции для определения видовых границ у разных таксонов состоит в том, что длительная изоляция близкородственных групп, индикатором которой служит эта величина, сама по себе не является обязательным условием (а только предпосылкой) образования новых видов (Ferguson 2002). Примером, иллюстрирующем сказанное, может служить

работа по филогеографии настоящих леммингов (*Lemmus*) (Fedorov et al., 1999, Fredga et al., 1999). Анализ изменчивости последовательностей *сyt b* у палеарктических представителей рода показал, что наибольшие различия наблюдаются не между признаваемыми и хорошо отличающимися видами, норвежским (*Lemmus lemmus*) и сибирским (*L. sibiricus*) леммингами, между которыми существует и географическая изоляция, а между западными и восточными популяциями сибирского лемминга с условной границей в районе дельты Лены. Было предложено и перекроить систематику леммингов в соответствии с этими дистанциями (Fredga et al. 1999; Shenbrot, Krasnov 2005).

Однако проведенный нами анализ показал, что гаплотипы леммингов из дельты р. Лены попадают в так называемую «западную» группу (Abramson et al. 2008), а так как лемминги распространены непрерывно по арктической тундре, и нет никаких физических преград между популяциями западной и восточной группы, то несомненно, что при дополнительном исследовании мы обнаружим в одной популяции особей с гаплотипами из разных митохондриальных клад. В данном случае глубина генетической дивергенции по митохондриальному геному отражает прошлую изоляцию в плейстоценовых рефугиумах и историю постплейстоценового расселения, но не образование новых видов. Значительная генетическая дифференциация может сохраняться в течение очень длительного времени и никаким образом не маркировать процесс видообразования. Необходимо различать генетические процессы, вовлеченные в процесс видообразования от генетических характеристик, по которым различается пара современных видов (Templeton, 1994).

Несмотря на то, что позднее основоположник филогеографии Д. Авайс отказался от идеи разграничивать виды на основе дистанции по цитохрому *b*, она была подхвачена Бэйкером и Брейдли (Baker & Bradley 2006). Авторы вернулись к генетической концепции вида (Bateson, 1909) и выдвинули вновь генетические дистанции в качестве критерия для выделения видов и фактически приравнивали понятие *вид* (по крайней мере, у млекопитающих) к понятию *филогруппы*. При этом они даже понизили порог выделения видов по цитохрому *b* до уровня различий в 5%. Согласно ожиданиям этих авторов при последовательном применении их критерия число видов

млекопитающих должно увеличиться еще на 2000. Напомним, что за прошедшие 10 лет между двумя изданиями списка видов млекопитающих мировой фауны (Wilson & Reeder 1993, 2005) их число уже увеличилось практически на 1000.

Следует отметить еще одно обстоятельство, связанное с применением ДНК-технологий, быстрым увеличением числа видов и открытия многочисленных криптических видов. Уже с начала 60-х годов систематики начали использовать для описания и выделения видов не только морфологические признаки, но также данные кариологии, аллозимного анализа, цитологии, иммунологии, но они применялись лишь немногими исследователями, в первую очередь потому, что эти методы требуют очень высокой экспертизы исследователя и особым образом собранного материала (культуры тканей или живых зверей, тканей, фиксированных строго определенным образом) или содержания лабораторной колонии животных, что не всегда доступно широкому кругу исследователей. В то же время работа с ДНК-маркерами не требует в целом ни того, ни другого. Методики осваиваются достаточно быстро, а для работы подходит зафиксированный в спирте очень небольшой фрагмент любой ткани животного, причем храниться такой фрагмент может достаточно долго, и исследователь может приступить к работе в любое время.

Кроме того, возможна работа и с коллекционным материалом, хранящимся в зоологических музеях, и вполне справедливо опасение, что в скором будущем именно такое смещение акцента в сторону молекулярных методов в изучении биологического разнообразия (по крайней мере, у позвоночных) приведет к тому, что новое поколение исследователей будет иметь очень приблизительные знания о биологии и диагностических признаках организмов, которые они изучают. Но вернемся к генетическим дистанциям. Сегодня известно уже довольно много примеров, когда дистанции между некоторыми изолированными популяциями (филогруппами) у позвоночных значительно превышают таковые между парами «хороших» видов и уровень не то что в 5%, а в 13%. Крайне неравномерна скорость эволюции одного и того же участка ДНК даже у очень близких видов.

В качестве одного из таких примеров можно привести узкочерепную полевку (*Microtus grega-*

lis). При исследовании изменчивости цитохрома *b* в изолированных популяциях этого вида мы столкнулись не только с крайне неравномерными темпами в изменчивости между отдельными популяциями, но и чрезвычайно завышенными темпами по сравнению с близкими видами этого же рода. Генетические дистанции между изолированными популяциями у этого вида превышают упоминавшиеся 13% и выше таковых не только у сестринских видов рода, но превышают и дистанции по этому маркеру у разных подродов рыжих полевок (Abramson, Kostygov 2007).

Следуя логике Бэйкера и Бредли, тут уже можно описать, по крайней мере, 3 вида, а если учесть что остаются еще не исследованными несколько изолированных географических популяций, то и больше. С другой стороны, дистанции по ядерным маркерам (LCAT, p. 53) дают совсем другие оценки. При этом при использовании ядерного маркера при той же топологии деревьев дистанции становятся вполне соразмерными с аналогичными дистанциями у других таксонов того же ранга.

Доказательство длительной генетической изолированности популяций недостаточно для того, чтобы признать за ними статус самостоятельных видов. Необходим комплексный подход к выделению видов и описанию видового разнообразия, а границы между видами должны устанавливаться с учетом данных самых различных дисциплин, таких как сравнительная анатомия, филогеография, популяционная генетика, экология и этология (Dayrat 2005). В рамках этих дисциплин уже существует достаточно широкий ассортимент методов для разграничения видов, и только применяя их согласованно можно достичь строгого описания видового разнообразия. Алгоритм такого анализа может состоять из следующих этапов: морфологи проводят описание морфологического разнообразия, анализируют изменчивость морфологических признаков и выдвигают гипотезу о морфологических видах (морфовиды). На следующем этапе валидность этих морфологических видов (или части из них) тестируется с помощью других подходов и дополнительных данных (молекулярных, поведенческих, онтогенетических и др.). Поскольку, как правило, такие исследования требуют значительных затрат времени и денег, в практической деятельности систематиков логично в первую очередь исследовать проблематичные комплексы видов и лишь затем – хорошо различимые и легко

диагностируемые морфологические виды. При этом следует подчеркнуть, что необходимость тестировать другими методами морфологические виды ни в коей мере не означает, что молекулярные методы, к примеру, заменят морфологический (Will & Rubinoff 2004).

Широкое увлечение применением молекулярных маркеров в филогении и систематике понятно и создает ощущение крупного прорыва в биологии вообще и в рассматриваемых дисциплинах в частности, в том числе и в отношении такого наболевшего вопроса, как критерий вида и установление видовых границ. Очень часто, когда появляется новая методика, мы рассматриваем ее как панацею, как универсальное средство, но не стоит надеяться на новый метод как на панацею: он, вне всякого сомнения, очень важен и очень нужен, но нельзя использовать одну методологию для решения такой проблемы, как определение видовых границ. Поскольку сама проблема вида проистекает из попыток свести в одном понятии таксономические категории и эволюционирующие группы, (иными словами, процесс и результат), то неразрешенность проблемы будет оставаться до тех пор, пока мы не признаем, что выделенные таксоны в своей основе субъективны (Heu 2001), и будем продолжать искать универсальную концепцию и универсальный критерий, в котором будем стремиться объединить две разных составляющих: единицу классификации и эволюционирующую группу. Выход из этой ситуации в признании таксономического плюрализма, в частности, «видового плюрализма» (Dupre 1999; Павлинов 2005, 2007), и трактовки вида как таксономической гипотезы (Panchen 1992; Heu 2001; Павлинов 1995), которая может быть подвергнута тестированию способами, описанными выше. Таким образом, сегодня все так же актуальны высказывания Ч. Дарвина: *«нет непогрешимого критерия, позволяющего различить виды и хорошо выраженные разновидности.... размеры различия, признаваемые необходимыми для возведения двух форм в степень видов, не поддаются определению»* (Дарвин 1991).

Несколько слов об идентификации видов и дискуссии вокруг ДНК-штрихкодов (barcoding). В идеале определение видов должно быть простым и эффективным, поскольку специалисты из очень разных областей (фармакологи, физиологи, экологи, паразитологи и др., иными словами –

пользователи таксономии) нуждаются в точном определении вида. Именно вокруг этой проблемы разгорелась жаркая дискуссия относительно «ДНК-штрихкодов» (Herbert et al. 2003; Wheeler 2005; Will & Rubinoff 2004 и др). Защитники идеи ДНК-штрихкодирования (Herbert et al. 2003, Herbert et al. 2005) полагают, что можно использовать фрагмент последовательности ДНК одного или нескольких генов для видовой идентификации, поскольку каждый вид обладает своим набором видоспецифичных позиций нуклеотидных оснований. В тех случаях, когда показано, что последовательность ДНК конкретного молекулярного маркера обеспечивает более быстрое и надежное определение вида, чем морфологические характеристики, нет оснований этим пренебрегать.

Можно привести много примеров из практики определения серых полевков, где сказанное более чем справедливо, а для симпатрических видов-двойников *Microtus arvalis* – *M. rossimeridionalis* – самый надежный и быстрый способ. Морфологически диагностировать эти виды невозможно, но в случаях, когда морфологические видовые отличия достаточно четкие и обеспечивают надежное и быстрое определение, нет смысла отказываться от морфологии в пользу ДНК-штрихкода. Не стоит рассматривать эти две системы определения видов как конкурирующие или исключаящие одна другую. Выбор в пользу того или иного способа идентификации в конкретных случаях будет зависеть как от конкретных объектов, так и от результатов, но обе системы можно использовать и параллельно. При этом необходимо четко представлять, что основанная на ДНК система диагностики может быть эффективной только в том случае, если последовательности молекулярного маркера, по которому ведется определение, для всех видов уже представлены в базе данных. Неполная база данных позволит пользователю лишь определить, насколько данная последовательность отличается от остальных, уже представленных в базе.

Такой результат не позволит определить видовую принадлежность экземпляра, при том это не будет автоматически указывать, что данный экземпляр – новый вид. Сказанное, однако, никак не умаляет инициативу ДНК-штрихкодирования, развернутую Институтом биоразнообразия в Канаде, а лишь подчеркивает, что на всех этапах (усилия по сбору, первичному определению, ку-

рирование коллекций ваучерных экземпляров) создание централизованной системы определения, основанной на ДНК-маркерах, будет сильно зависеть от экспертной оценки специалистов – систематиков «классической» школы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Приношу огромную благодарность А.Ф. Алимову и С.Д. Степаньянц (ЗИН РАН) за приглашение принять участие в работе Совета по проблемам общей биологии, посвященного проблеме вида и видообразования, Л.Я. Боркину, В.М. Лоскогу, Костыгову А.Ю., Кривоухатскому В.А., Сиделевой В.Г. (ЗИН РАН), И.Я. Павлинову (ЗММУ, Москва) за плодотворные дискуссии, С.В. Афанасьеву (ИЭФиБ им.Сеченова, Санкт-Петербург) за критические замечания и первичную редакцию рукописи. Работа была частично поддержана фондом РФФИ (гранты №№ 06-04-49294-а; 09-04-01330-а), а также программами фундаментальных исследований РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов» и «Эволюция и происхождение биосферы».

ЛИТЕРАТУРА

- Абрамсон Н.И.** 2007. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы. *Вестник ВОГиС*, **11**, № 2: 307–331
- Абрамсон Н.И., Родченкова Е.Н. и Костыгов А.Ю.** 2009. Генетическая изменчивость и филогеография рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*, Arvicolinae, Rodentia) на территории России с анализом зоны интрогрессии мт ДНК близкородственного вида – красной полевки (*Cl. rutilus*). *Генетика* **45**, № 5: (в печати).
- Абрамсон Н.И., Родченкова Е.Н., Фокин М.В., Ракитин С.Б., и Гилева Э.А.** 2009. Современная и историческая интрогрессия митохондриальной ДНК между красной (*Clethrionomys rutilus*) и рыжей (*Clethrionomys glareolus*) полевками (Rodentia, Cricetidae). *Доклады Российской Академии Наук*, **425**, № 3: 415–418
- Дарвин Ч.** 1991. *Происхождение видов путем естественного отбора или сохранение благоприятных рас в борьбе за жизнь*. Пер. с 6-го издания (Лондон 1872). Отв. ред. А.Л. Тахтаджян. Издательство «Наука», Санкт-Петербург, 540 с.
- Майр Э.** 1971. *Принципы зоологической систематики*. Издательство «Мир», Москва, 454 с.
- Павлинов И.Я.** 1995. Классификация как гипотеза: вхождение в проблему *Журнал общей биологии* **53**, № 5: 757–767.
- Павлинов И.Я.** 2005. Введение в современную филогенетику. Издательство «КМК», Москва, 391 с.

- Павлинов И.Я.** 2007. Этюды о метафизике современной систематики. С. 123–182. *Линнеевский сборник*. Издательство МГУ.
- Родченкова Е.Н. и Абрамсон Н.И.** 2007. Молекулярные данные в исследовании межвидовых взаимодействий на примере рыжей (*Clethrionomys glareolus*) и красной (*Cl. rutilus*) полевок: древняя гибридизация с интродукцией или современная гибридная зона? С. 228–234 в кн: *Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики: Материалы международной конференции (Черноголовка, 26–30 ноября 2007г.)*. Издательство КМК, Москва.
- Тарасов О.В., Журавлева Г.А. и Абрамсон Н.И.** 2008. Оценка возможности применения гена, кодирующего фактор терминации трансляции ERF3, в качестве филогенетического маркера. *Молекулярная биология*, **42**, № 6: 937–946
- Abramson N.I. and Kostygov A.Yu.** 2007. Revealing phylogenetic signal of mitochondrial and nuclear DNA: case study of subfamily Arvicolidae (Cricetidae, Rodentia) С. 3–6. In: *Вычислительная филогенетика и геносистематика «ВФГС 2007»*. Материалы международной конференции, Издательство КМК, Moscow.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R., Bermingham E.; Lamb T.; Neigel J.E.; Reeb C.A. and Saunders N.C.** 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of Ecology and Systematics*, **18**: 489–522.
- Avise J.C. and Johns G.C.** 1999. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**: 7358–7363.
- Avise J.C.** 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, MA: Harvard University Press, 464 P.
- Ayala F.J.** 1975. Genetic differentiation during the speciation process. *Evolutionary Biology*, **8**: 1–78.
- Baker R. and Bradley R.** 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*, **87** (4): 643–662.
- Bateson W.** 1909. Heredity and variation in modern lights P. 85–101. In: (A.S. Steward, ed.). *Darwin and modern science* Cambridge University Press, United Kingdom.
- Brunhoff C., Galbreath K.E., Fedorov V.B., Cook J.A., and Jaarola M.** 2003. Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Molecular Ecology*, **12**: 957–968.
- Cain A. J.** 1954. *Animal species and their evolution*. New York: Harper & Row. 190 p.
- Cracraft J.** 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, **1**: 159–187
- Cracraft J.** 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation P. 28–59. In: D. Otte, J.A. Endler (Eds.) *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Dayrat B.** 2005 Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society*, **85**: 407–415.
- Defontaine V., Libois R., Kotlik P., Sommer R., Nieberding C., Paradis E., Searle J.B., and Michaux J.R.** 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, **14**. P. 1727–1739.
- Defontaine V., Osipova O., Henttonen H., Libois R. and Michaux J.R.** 2006. Phylogeography and Interspecific hybridization of bank voles (*Clethrionomys glareolus* and *rutilus*) in the Eurasian region. *Hystrix, The Italian Journal of Mammology*, (n.s.) supplement: 42.
- Dupre J.** 1999. On the impossibility of a monistic account of species. In: R.A. Wilson (ed.) *Species: new interdisciplinary essays* L.: MIT Press: 3–21.
- Edwards S.V. and Beerli P.** 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution*, **54**: 1839–1854.
- Fedorov V.B., Goropashnaya A.V., Jarell G.H. and Fredga K.** 1999. Phylogeographic structure and mitochondrial DNA variation in true lemmings (*Lemmus*) from the Eurasian Arctic. *Biological Journal of Linnean Society*, **66**: 357–371.
- Ferguson J.W.H.** 2002. On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological Journal of Linnean Society*, **75**: 509–516.
- Fredga K., Fedorov V., Jarell G. and Jonsson L.** 1999. Genetic diversity in Arctic Lemmings. *Ambio*, **28** (3): 261–269.
- Funk D.J. and Omland K.** 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **34**: 397–423.
- Graham M.** 1996. Birds in double trouble. *Nature*, **380**: 666–667.
- Harris J.D. and Froufe E.** 2005. Taxonomic inflation: species concept or historical geopolitical bias? *Trends in Ecology and Evolution*, **20** (1): 6–7.
- Hendry A.P., Vamosi S.M., Latham S.J., Heilbut J.C. and Day T.** 2000. Questioning species realities. *Conservation Genetics*, **1**: 67–76.
- Herbert P.D.N., Cywinska A., Ball, S.L., and deWaard, J.R.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of Royal Society, London, Series B*, **270**: 313–321.
- Herbert, P. D.N., Penton E.N., Burns J.M., Jansen D.H. and Hallwachs W.** 2005. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical

- skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, **101**: 14812–14817.
- Hey J.** 2001. The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution*, **16** (7): 326–329.
- Isaac N.J.B., Mallet J. and Mace G.M.** 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **19** (9): 464–469.
- Kotlatat M.** 1997. European freshwater fishes. An heuristic checklist of the freshwater fishes of Europe (exclusive of former USSR), with an introduction for nonsystematists and comments on nomenclature and conservation. *Biologia*. **52** (Suppl. 5): 1–271.
- Mayden R.L.** 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem In: (M.F. Claridge, H.A. Dawah, M.R. Wilson (Eds). *Species: The units of biodiversity* London: Chapman and Hall, P. 381–424.
- Mayr E.** 1996. What is a species, and What is not? *Philosophy of Science*, **63**: 262–277.
- Nichols R.** 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, **16** (7): 358–364.
- Panchen A.L.** 1992. *Classification, evolution, and the nature of biology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 398 p.
- Peterson A.T. and Navarro-Siquenza A.G.** 1999. Alternative species concepts as bases for determining priority conservation areas. *Conservation Biology*, **13**: 427–431.
- Rosenberg N.A.** 2003. The shapes of neutral gene genealogies in two species: probabilities of monophyly, paraphyly, and polyphyly in a coalescent model. *Evolution*, **57** (7): 1465–1477.
- Shenbrot G.I. and Krasnov B.R.** 2005. *An atlas of the Geographic distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae)*. Pensoft, Sofia–Moscow. 336 p.
- Sites J.W. and Marshall J.C.** 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, **35**: 199–227.
- Spitzenberger F., Strelkov P.P., Winkler H. and Haring E.** 2006. A preliminary revision of the genus *Plecotus* (Chiroptera, Vespertilionidae) based on genetic and morphological results. *Zoologica Scripta*. **35**: 187–230.
- Templeton A.R.** 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. P. 131–156. In: *Molecular approaches to ecology and evolution* De Salle R., B. Schrierwater (Eds.) Basel: Birkhäuser.
- Wheeler Q.D.** 2005. Losing the plot: DNA «barcodes» and taxonomy. *Cladistics*, **21**: 405–407.
- Wheeler Q. D. and Platnick N.I.** 2000. The phylogenetic species concept (sensu Wheeler and Platnick) P. 55–69. In: Q.D. Wheeler, K. Meier (Eds.) *Species concepts and phylogenetic theory. A debate* N.Y.: Columbia Univ. Press.
- Will K.W. and Rubinoff D.** 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics*, **20**: 47–55.
- Wilson, D.E., and Reeder D.M** (eds). 1993. *Mammal Species of the World* (2nd ed.), Smithsonian Institution Press, 1206 p.
- Wilson D.E. and Reeder D.A.M.** (eds). 2005. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed), Johns Hopkins University Press, 2, 142 p.
- Zink R.M.** 1996. Bird species diversity. *Nature*, **381**: 566.