

## МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ И СОВРЕМЕННАЯ ФИЛОГЕНЕТИКА МЛЕКОПИТАЮЩИХ<sup>1</sup>

© 2004 г. А.А. Банникова

Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Ленинские горы, Москва, 119992

e-mail: grechko@genome.eimb.relarn.ru

*Памяти Б.М. Медникова*

В обзоре разбираются основные молекулярные маркеры, используемые в филогенетических реконструкциях млекопитающих, — митохондриальные и ядерные гены, сателлитная ДНК, короткие и длинные ретропозоны. Рассмотрены проблемы филогенетических реконструкций по генным последовательностям — выбор гена и внешней группы, сдвиг нуклеотидного и аминокислотного состава, эффект притяжения длинных ветвей, размер выборки и длина последовательности. Значительная часть обзора посвящена разбору методов мультилокусного анализа ДНК (RAPD, RFLP, IS-PCR, ISSR-PCR, AFLP). Обсуждаются их достоинства и недостатки, приводятся примеры удачного и неудачного применения на разных таксономических уровнях. Обсуждены возможные причины несоответствия молекулярно-филогенетических реконструкций между собой и морфологическим гипотезам. Кратко рассмотрены новейшие представления о макрофилогении плацентарных млекопитающих, основанные на молекулярно-генетических данных. Показана высокая надежность предложенных молекулярными филогенетиками гипотез о делении плацентарных на Afrotheria (включая Afrosoricida) и Laurasiatheria, монофилии клад Euarchontoglires и Cetartiodactyla. Сделан вывод, что тщательный анализ соответствий и противоречий между разными данными и поиск конгруэнтных заключений, сделанных по разным признакам, — это наиболее продуктивный путь развития филогенетики.

---

<sup>1</sup>Статья написана по заказу редакции «Журнала общей биологии».

Молекулярно-генетический анализ стал сегодня почти необходимой частью любого филогенетического таксономического исследования. Число работ, основанных на полных последовательностях индивидуальных генов или их участках, на сравнении более или менее протяженных повторяющихся последовательностей или на интегральной оценке общего сходства геномной ДНК, растет как снежный ком. В распоряжении геносистематиков теперь есть подходы, позволяющие вести исследования на самых разных уровнях – от индивидов и популяций до отрядов и надотрядных категорий. Эти подходы можно условно подразделить на следующие категории, что, однако, достаточно условно, поскольку большинство относящихся к ним методик пересекаются.

1. Определение нуклеотидной последовательности отдельных генов или некодирующих участков ДНК и ее сравнение у разных организмов. В результате возможно установить, какие конкретные замены нуклеотидов произошли в анализируемом участке ДНК в разных филетических линиях.

2. Поиск таксонспецифичных семейств повторяющихся последовательностей или отдельных копий известных повторов, общих для ДНК разных видов. Этот подход позволяет выявить соответствие между эволюцией таксонов и появлением и распространением в геномах отдельных генетических элементов и семейств повторов.

3. Сопоставление протяженных анонимных участков генома с неизвестными функциями и часто неясной локализацией путем сканирования мутаций по всему геному – разные варианты ПЦР, ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), молекулярная ДНК×ДНК гибридизация. Эта группа методов дает общую оценку молекулярно-генетического сходства видов.

Реконструкции, проведенные на основании разных молекулярных данных, далеко не всегда согласуются не только с «морфологическими», но и между собой. Например, среди плацентарных млекопитающих реальность *Afrotheria* поддерживается данными по строению мтДНК и яДНК (Stanhope et al., 1998; Murphy et al., 2001 a,b; Nikaido et al., 2003 a,b), но не морфологически (Asher, 1999), тогда как монофилия *Eulipotyphla* подтверждается на уровне ядерного генома (Stanhope et al., 1998), но не митохондриального (Mouchaty et al., 2000 a). Из-за противоречивости молекулярных данных остается открытым вопрос о монофилии грызунов (Graur et al., 1991; D'Erchia et al., 1996; Reyes, et al., 2000; Huchon et al., 2002).

Основные предпосылки расхождения морфологических и молекулярных реконструкций заключаются в том, что на морфологическом уровне проявляется только малая часть геномов. В случае же молекулярных данных в анализ включается большое

количество “молчащих”, фенотипически не проявляющихся нейтральных мутаций нефункциональных участков генома, в большей степени подверженных параллельной и конвергентной эволюции (Gatesy et al., 2001).

Что касается разнообразия конкурирующих между собой молекулярных гипотез, то, очевидно, на результаты филогенетического анализа влияют особенности конкретных молекулярных маркеров. Так, кодирующие последовательности ДНК (гены) прямо связаны с фенотипом. Соответствующие им признаки вероятнее всего отражаются на приспособленности организма. Поэтому гены изменяются медленнее некодирующих последовательностей и подвержены конвергентной эволюции, что, разумеется, отражается на реконструированных на их основе филогениях. Причина расхождения реконструкций, полученных на основе митохондриальных последовательностей и ядерных генов, может заключаться в том, что внеядерная ДНК передается только по материнской линии и, следовательно, наследуется не по менделевским законам (Chikuni et al., 1995). С другой стороны, обмен генами между ядерной и митохондриальной ДНК (Arctander, 1995) приводит к тому, что в яДНК обнаруживаются копии митохондриальных последовательностей, которые не экспрессируются и представляют собой псевдогены. Полученные в результате амплификации геномной ДНК фрагменты могут на самом деле быть ядерными гомологами митохондриальных генов, что тоже может вызвать ошибки филогенетических реконструкций. Другой источник значительного числа ошибок и противоречий — необоснованное использование тех или иных маркеров или слишком малый набор признаков и таксонов и методы интерпретации первичной филогенетической информации, которые основаны по большей части на моделировании.

Арсенал маркеров и методов современной геносистематики достаточно обширен. Все они имеют свои положительные и отрицательные стороны и разную степень разрешающей способности в зависимости от целей конкретного исследования. В настоящей статье кратко рассмотрены основные достоинства и недостатки некоторых молекулярных маркеров (табл. 1), наиболее широко используемых в филогенетике в первую очередь млекопитающих — группы, с которой непосредственно работает автор. Основу обзора составили исследования по молекулярной филогенетике млекопитающих за период главным образом последних десяти лет.

### МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК

Сложившееся в филогенетических исследованиях представление об исключительности митохондриальных маркеров сегодня подвергается сомнению. Привлекательность этого маркера связана, в частности, с малыми размерами

митохондриального генома, в связи с чем он проще для анализа и потому изучен гораздо подробнее, чем ядерный. В базе данных Genebank имеются данные по частичной последовательности мтДНК представителей всех современных отрядов плацентарных млекопитающих, а для более половины отрядов – результаты полного секвенирования мтДНК. Среди млекопитающих скоро не останется ни одного семейства, для которого не была бы расшифрована хотя бы частичная последовательность гена цитохрома b (*cytb*).

Наиболее полное в таксономическом отношении «митохондриальное древо» построено Арнэсоном с соавт. (Arnason et al., 2002) для 60 представителей всех отрядов на основе полных митохондриальных геномов. Предложенная филогенетическая гипотеза во многом противоречит как традиционным представлениям о родстве таксонов, так и данным по яДНК. Это относится и к другим макроэволюционным построениям при использовании мтДНК.

Возможно, что причина хаоса в филогенетических отношениях, устанавливаемых по этому маркеру, — высокая и/или атипичная скорость мутаций в мтДНК (Waddell et al., 2001). Средняя скорость нуклеотидных замен в мтДНК обычно превышает таковую для яДНК в 5-10 раз и оценивается в 2-4% за млн. лет (Brown et al., 1979; Wilson et al., 1985). Скорость накопления несинонимичных замен (т.е. замены нуклеотидов, приводящие к аминокислотным заменам) в мтДНК и яДНК сопоставимы, но синонимичные замены, которые не приводят к заменам аминокислот («молчащие» замены), появляются в митохондриальном геноме в 100 раз чаще (Pesole et al., 1992). Высокая частота замен в митохондриальном геноме еще более усиливает по сравнению с яДНК «эффект насыщения» в нуклеотидной последовательности и экранирует «филогенетический» сигнал. Например, у приматов кривая дивергенции *cytb* выходит на плато по истечении 15-20 млн. лет при 25% различий (Brown et al., 1982). В дальнейшем замены концентрируются в положениях, которые уже были замещены, т.е. наступает насыщение, которое является источником гомоплазий (молекулярных конвергенций). В результате мтДНК видов, разошедшихся 80 млн. лет назад, отличается немногим больше, чем видов, отделившихся от общего предка не более 20 млн. лет назад.

Скорость возникновения замен варьирует на разных участках мтДНК: 12S и 16S рДНК изменяются медленно, а D-петля – быстро. Но даже «медленные» рибосомные гены оказались бессильны разрешить дивергенцию самых древних (надотрядного уровня) линий эутерий, с чем и связаны явная полифилия некоторых группировок, их странные взаимосвязи и низкое разрешение дендрограмм (политомическое ветвление). На основе 12S рРНК не всегда удается прояснить взаимоотношения таксонов и менее высокого ранга, например, порядок дивергенции основных крупных филогенетических линий грызунов

(Nedbal et al., 1994; Catzeflis et al., 1992; 1995) и хищных (Ledje, Arnason, 1996). Во многих исследованиях по 12S рРНК делается вывод об исходной политомии исследуемых группировок, которую авторы объясняют быстрой дивергенцией в короткий отрезок времени. Но скорее всего в большинстве этих случаев ген 12S рРНК оказывается просто недостаточно консервативным, для установления последовательности таких древних событий, как дивергенция надотрядов и даже семейств: филогенетический сигнал теряется в шуме гомоплазий (неоднократных прямых и обратных замен). Кроме того, 12S рРНК имеет несколько высоко вариабельных участков, что затрудняет выравнивание и увеличивает вероятность попадания в анализ негомологичных признаков. Вместе с тем секвенирование рибосомных генов мтДНК интенсивно используется в изучении эволюции грызунов на более низком таксономическом уровне (Dubois et al., 1996; Nedbal et al., 1996; Montgelard et al., 2002).

Ген *cytb* также широко используется в качестве филогенетического инструмента. На его основе изучены взаимоотношения видов и родов европейских муroidных грызунов из подсемейств Arvicolinae и Murinae (Martin et al., 2000), подтверждено монофилетическое происхождение видов рода *Marmota* и его северо-американское происхождение (Steppan et al., 1999), выполнен ряд исследований в области молекулярной филогенетики парнокопытных (Chikuni et al., 1995; Janecsek et al., 1996).

Однако результаты филогенетических исследований таксонов ранга рода и вида тоже часто противоречивы или неразрешимы с помощью митохондриальных генов. Сравнение 402 п.н. гена *cytb* нескольких видов землероек рода *Crocidura* из юго-восточной Азии, а также *Suncus murinus* и *C. sibirica* (Motokawa et al., 2000) подтверждает основанные на биохимических данных соображения о полифилетичности рода *Crocidura* (Maddalena, 1990; Jenkins, 1998). Но в другой работе, где было секвенировано 549 п.н. гена 16S рРНК, род *Crocidura* оказался монофилетичным (Querouil et al., 2001). Для ряда видов землероек рода *Sorex* положение на филогенетическом древе так и осталось неясным несмотря на интенсивное изучение их генетических связей с помощью маркеров *cytb* (Ohdachi et al., 1997; Fumagalli et al., 1999).

У ежей рода *Erinaceus* секвенирование гена *cytb* выявило миоцен-плиоценовую дивергенцию видов *E. europaeus* и *E. concolor* и плейстоценовую дифференциацию на две клады внутри каждого из них (Santucci et al., 1998). Данные по последовательности двух ядерных интронов (7-ой интрон гена бета-фибриногена и 2-ой интрон гена миоглобина) подтвердили положение о дивергенции этих видов и существование восточной и западной ветвей в составе *E. concolor*, но не *E. europaeus* (Seddon et al., 2001). Авторы объясняют это возможным различием истории мтДНК и яДНК в изолированных популяциях видов:

на гаплоидной мтДНК прохождение через «бутылочное горлышко» могло сказаться более, чем на сложном диплоидном ядерном геноме. Кроме того, время дивергенции таксонов по данным секвенирования гена *cytb* оказалось завышенным относительно данных по ядерным интронам примерно в 1,5 раза. Таким образом, причина противоречий в оценке данных, полученных при изучении митохондриальных и ядерных последовательностей на микроэволюционном уровне может состоять и в разной степени зависимости этих процессов от эффективной численности популяции, а также объясняться тем фактом, что внеядерная ДНК передается у млекопитающих только по материнской линии и, следовательно, наследуется не по менделевским законам (Chikuni et al., 1995).

### **Микрогеографическая изменчивость митохондриальных генов**

Поскольку митохондриальные последовательности значительно более полиморфны, чем ядерные, их целесообразно использовать в популяционных исследованиях. Изучение микрогеографической изменчивости митохондриальных генов дало импульс развитию нового направления — филогеографии (Avice, 1998, Hewitt, 2001), изучающей географическое распространение генеалогических линий, рассматривая изменения генома в пространстве и во времени. В связи с развитием этого направления в последние годы сделан необычайный прорыв в понимании послеледниковой экспансии животных и растений Европы и Беренгии и плейстоценовых изменений их ареалов. Для целого ряда европейских видов найдены гибридные зоны между расами и подвидами, простирающиеся через Центральную Европу с севера на юг и разделяющие их геномы на западную и восточную формы. Из млекопитающих это, например, две формы домового мыши *Mus domesticus* и *M. musculus* (Dallas et al., 1995; Boursot et al., 1996), землеройки-бурозубки из группы видов *Sorex araneus* (Taberlet et al., 1994), европейский и белогрудый ежи *Erinaceus europaeus* и *E. concolor* (Santucci et al., 1998). Подробный разбор этих и других случаев приведен в обзоре Хьюитта (Hewitt, 2001).

Кроме того, на основе митохондриальных последовательностей предложен подход к анализу миграций млекопитающих, который позволяет получить оценку расстояний и скоростей миграций (Neigel et al., 1991), метод анализа изменений в структуре популяций в связи с плотностью (Plante et al., 1989), а также способ определения направления скрещиваний и исследования популяционно-генетической динамики демографических показателей самок (Neigel, Avice, 1986; Harrison, 1989).

С привлечением мтДНК к решению микроэволюционных вопросов сильно продвинулось изучение гибридизации на основе выявления замещенных участков митохондриального генома у гибридных видов. Один из удачных примеров такого рода

исследований — изучение гибридизации между четырьмя видами сусликов Поволжья (Ермаков и др., 2002). Секвенирование и рестриктазный анализ контрольной области мтДНК большого (*Spermophilus major*), желтого (*S. fulvus*), малого (*S. pygmaeus*) и крапчатого (*S. suslicus*) сусликов выявили у 43% особей большого суслика чужеродные митотипы, специфичные для желтого и малого сусликов. В дальнейшем определение первичной структуры интрона 13 гена BCR показало, что и для ядерного генома большого, а также желтого сусликов характерно присутствие сразу двух устойчивых гаплотипов, отличающихся на видовом уровне, что, по мнению авторов, подтверждает гибридную природу данного явления (Ермаков и др., 2003).

Изменчивость мтДНК широко и тщательно исследуется на разных уровнях, но каким образом и могут ли вообще эти данные быть использованы для обоснования монофилии таксона, устанавливаемой по ядерным локусам? Возможна ли экстраполяция одних данных на другие? В этой связи был предложен количественный способ оценки взаимосвязи между монофилией таксонов по митохондриальным и нейтральным ядерным локусам в панмиктических популяциях – «правило троекратности» (Palumbi et al., 2001). Группа представителей некоторого таксона считается монофилетической по большинству нейтральных локусов яДНК в случае, если длина ветви, соответствующей этому таксону на древе мтДНК, в три раза превышает среднюю вариабельность последовательностей мтДНК внутри этого таксона. Эмпирическое подтверждение «правила троекратности» основано на данных по последовательности гена *cytb* и ядерных интронов гена актина у семи видов китообразных. Установлено, что виды, которым соответствуют длинные ветви на митохондриальном древе и которые характеризуются невысокой внутривидовой изменчивостью, имеют больше шансов попасть в единую группу, в то время как виды, которым соответствуют короткие ветви митохондриального древа, на древе ядерных генов окажутся членами разных групп.

Итак, быстрая дивергенция мтДНК ограничивает шкалу времени, в пределах которой она может дать полезную информацию на надвидовом уровне. Поэтому исследования, имеющие отношения к проблемам эволюции в широких пределах шкалы времени, предпочтительно проводить на более консервативных последовательностях яДНК.

## ГЕНЫ ЯДЕРНОЙ ДНК

Для изучения филогений животных наиболее часто используют гены рРНК, гистоновые и другие структурные гены, а также более изменчивые последовательности, разделяющие индивидуальные гены рРНК, называемые внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS) и наружными, или межгенными, спейсерными последовательностями

(NTS). С помощью таких кодирующих белки генов как A2AB (аквипорин, адренергетический рецептор  $\alpha$ -2B), IRBP (ретиноидный интерфото-рецептор), vWF (фактор Фон Виллибрандта), 11-й экзон гена BRCA1 делаются попытки восстановить эволюционные взаимоотношения далеких таксонов, время дивергенции которых составляет более 50 млн. лет. Так, очень большой ядерный ген M6P/IGF2R послужил хорошим источником информации для получения достаточно «разрешенного» филогенетического древа отрядов млекопитающих (Killian et al., 2001). Сестринские взаимоотношения сумчатых (Metatheria) и плацентарных (Eutheria) относительно однопроходных (Prototheria) получили здесь безоговорочное подтверждение, что согласуется с традиционной анатомо-морфологической гипотезой (Marshall, 1979), но противоречит результатам секвенирования полной мтДНК. Группирование ежа и летучей мыши с когортой Ferungulata согласуется с результатами исследований других ядерных генов (Springer et al., 1997; Stanhope et al., 1998).

Сравнительный анализ филогенетических возможностей ядерных и митохондриальных генов на уровне таксонов высокого ранга показал, что ядерные экзоны (кодирующие участки ядерных генов) более подходят для этих целей, чем гены мтДНК (Springer et al., 2001). Причем это относится как к индивидуальным генам, так и к комбинированным последовательностям нескольких генов. Общая скорость нуклеотидных замен наиболее высока для митохондриальных генов, затем следуют ядерные гены в порядке vWF, IRBP, рРНК и A2AB. В связи с меньшей скоростью замещения насыщение сайтов в яДНК происходит медленнее, чем в мтДНК.

Различие между разными сайтами по скорости замен в ядерных генах также ниже, чем в митохондриальных, замены распределены равномернее, а вероятность повторных замещений в одном и том же сайте ниже. Предположение о том, что для достижения нужного уровня разрешения ветвей на древе для яДНК требуется большая длина последовательности, чем для мтДНК (Arnason et al., 1999), не подтверждается (Springer et al., 2001).

Иногда для секвенирования используют комплементарную ДНК (кДНК), синтезированную на матрице РНК с участием обратной транскриптазы. Клоны кДНК пока получены для представителей очень немногих отрядов млекопитающих. Тем не менее, кДНК, состоящая только из кодирующих последовательностей структурных генов, тоже может быть действенным орудием для реконструкции филогений. У пяти видов млекопитающих из четырех отрядов кДНК пепсиногенов А и С была использована для прояснения филогенетического положения Eulipotyphla (Narita et al., 2001). Результаты филогенетического анализа поддерживают близость между Eulipotyphla и Chiroptera;

Carnivora оказываются сестринским таксоном этих отрядов; монофилетичны как отряд Rodentia, так и клада Glires (Rodentia+Lagomorpha). Целесообразность использования кДНК возрастает, если учесть опасность спутать интересующий нас ген с псевдогеном, о чем будет сказано ниже.

Для исследования таксономических связей на уровне рода и вида пригодны более переменчивые последовательности. К ним относятся, например, интроны — некодирующие участки гена, которые вырезаются из мРНК в процессе сплайсинга. Хотя интроны эволюционируют быстрее экзонов, тем не менее скорость накопления мутаций в них ниже, чем в генах мтДНК. Это особенно важно для разрешения тех узлов древа, в которых филогенетический сигнал по мтДНК ослаблен вследствие насыщения заменами. Кроме того, интроны, как не кодирующие последовательности, менее подвержены конвергентной эволюции.

Несмотря на очевидные преимущества, ядерные последовательности реже используют в филогенетических исследованиях, чем митохондриальные из-за трудностей с их выделением

из больших и сложных эукариотических геномов. Как правило, для разных видов изучены последовательности разных генов. Это делает межвидовые сравнения фактически невозможными.

## ПРОБЛЕМЫ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ПО ГЕННЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ

Результативность и объективность молекулярно-филогенетических исследований зависит от множества факторов. Важнейшими причинами, которые могут приводить к несогласованности молекулярно-филогенетических гипотез и/или их низкой статистической поддержке, являются: недостаточный набор экспериментальных данных (длина последовательностей), выбор неадекватных для цели исследования генов, ошибки при секвенировании и выравнивании последовательностей, выбор исследуемых таксонов, их неправильное определение, конвергентная или быстрая эволюция, гибридизация, горизонтальный перенос генов, внутри- и межгенная рекомбинация, смешение орто- и паралогичных генов в анализе, неполнота концертной эволюции, неодинаковая скорость накопления замен в разных таксонах и в разных позициях последовательностей, различия в нуклеотидном составе анализируемых последовательностей, нестационарность нуклеотидного состава, взаимозависимость эволюции отдельных сайтов в последовательностях, принятие неадекватной модели молекулярной эволюции и алгоритма построения деревьев.

Описанию и анализу «подводных камней» молекулярной филогенетики посвящено множество работ (см. напр. обзор: Wendel, Doyle, 1998). Ниже будут кратко рассмотрены только некоторые важнейшие из указанных факторов.

### Что такое «хороший» ген?

Разные гены далеко не всегда содержат один и тот же филогенетический сигнал. Выше уже были приведены примеры по мтДНК, однако это в равной мере относится и к ядерным генам. Например, из наиболее часто используемых для филогенетических исследований генов *vWF*, *IRBP*, *BRCA1*, *A2AB* и *GHR* только последние два поддерживают монофилию грызунов (Adkins et al., 2001; Huchon et al., 2002). Для грызунов показано, что из этих генов наименьшей скоростью замен характеризуется вторая позиция кодона *A2AB*, далее по степени возрастания скорости следует первая позиция кодона этого же гена, затем ген *IRBP* (вторая позиция), *vWF* (вторая позиция), *IRBP* (первая позиция) и *vWF* (первая позиция) (Huchon et al., 2002).

Известно, что третий нуклеотид большинства кодонов в транслируемых участках гена наиболее вариабилен из-за вырожденности кода (Zardoya, Meyer, 1998). Вследствие этого количество замен в третьем положении кодона, например, гена *cytb* в 4-5 раз превышает количество замен в первой позиции (Hassanin et al., 1998) и приблизительно в 2.5 раза выше скорости трансверсий в генах рРНК (0.2% за 1 млн. лет), что составляет 0.5% за 1 млн. лет (Irwin et al., 1991). Так, в отряде грызунов группировка *Hystriognathi+Geomyoidea* имела высокую статистическую-поддержку в анализе по третьей позиции кодона ядерного гена *IRBR*, но отсутствовала в анализах, исключаящих эту позицию (DeBry, Sagel, 2001), что с большой вероятностью можно отнести за счет ложного филогенетического сигнала в связи с насыщением. Поэтому, когда речь идет об эволюции давно дивергировавших таксонов высокого ранга на основе исследования быстро эволюционирующих последовательностей, следует исключать данные по третьим позициям из анализа и, наоборот, опираться на них при изучении филогенетических связей близких видов и родов.

При анализе нуклеотидных последовательностей, особенно митохондриальных генов следует уделять внимание соотношению трансверсий (замены пуринов/пиримидин или пиримидин/пуринов) и транзиций (замены одного пуринового или пиримидинового основания на другое такого же типа). При случайном характере замещений среди мутаций должны преобладать трансверсии. Высокая частота транзиций усиливает вероятность реверсий и таким образом уменьшает величину дивергенции между далеко отстоящими таксонами. Трансверсии происходят гораздо реже, чем транзиции, в меньшей степени, чем

транзиции подвержены гомоплазиям, и у млекопитающих имеют почти линейную тенденцию к накоплению в течение примерно 80 млн. лет (Brown et al., 1982). Вследствие этого у далеких видов доля трансверсий в числе замен, по которым они различаются, выше, чем у близкородственных. Показано, что редкие типы трансверсий обнаруживаются лишь у эволюционно старых видов, причем соотношение транзиций и трансверсий изменяется в пользу последних с увеличением времени дивергенции сравниваемых таксонов (Челомина и др., 1998а; Челомина, 2000). Поэтому для оценки генетического родства не слишком удаленных видов следует использовать транзиции. При работе с быстро эволюционирующими последовательностями имеет смысл анализировать только трансверсии.

Сравнительное исследование пригодности 13 кодирующих белки генов мтДНК для реконструкции филогенетических отношений далеко отстоящих таксонов показало (Russo et al., 1996), что наилучшим из них является ген пятой субъединицы никотинамид адениндинуклеотид дегидрогеназы (ND5), за ним следуют гены ND4 и *cytb*. Причем это относится в равной мере к использованию и нуклеотидных, и аминокислотных последовательностей. Пригодность генов для филогенетического анализа в данном случае определялась по возможности генерировать на основе каждого из них древа той же топологии, что и по результатам анализа всех генов, вместе взятых. С этой точки зрения гены COII (цитохромоксидаза, субъединица II), ND1 и ND4I оказались наименее пригодными для филогенетических построений. Отметим, что гены, перечисленные автором этой работы в числе лучших, отличаются от «худших» меньшей длиной нуклеотидной последовательности.

Анализ ядерных геномов имеет дополнительные трудности, заключающиеся в том, что только *ортологичные* гены подходят для филогенетических реконструкций. Ортологичные гены – это последовательности, которые образовались в ходе кладогенеза, т.е. исходно гомологичные гены. Далее в ходе эволюции гены могут дублироваться во множестве копий, в результате возникают *паралогичные* гены. В некоторых случаях количество паралогичных генов, кодирующих один и тот же белок, может измеряться сотнями. Однородность их структур поддерживается специальными механизмами унификации, в ходе которых образуется и некоторое число дефектных генов, которые не принимают участия в синтезе соответствующих мРНК.

При избыточном числе паралогичные гены не испытывают жесткого давления отбора и могут со временем сильно измениться по сравнению с исходными. Такие производные генов называются *псевдогенами*. Всегда существует некоторая вероятность клонировать, амплифицировать и определить нуклеотидную последовательность псевдогена вместо

интересующего нас гена. Изменения в нуклеотидной последовательности псевдогена накапливаются быстрее, чем в исходном гене, и могут создать ложное впечатление быстрой эволюции изучаемой последовательности с соответствующим искажением филогенетического древа.

Открытие «негрызунычье» молекулярной природы морской свинки, что установлено на основе не только полного митохондриального генома (D'Erchia et al., 1996; Janke et al., 1997), но и ядерных инсулиновых генов (Graur et al., 1991; Li et al., 1992), до сих пор не имеет объективного объяснения. Вполне возможно, что этот артефакт – следствие не только аномального мутирования инсулиновых генов, которое повлекло за собой каскадную эволюцию ряда других последовательностей (Frye, Hedges, 1995). Возможно, дело также в паралогии инсулиновых генов, аминокислотные последовательности которых анализировали (Cao et al., 1997).

Поскольку у одних видов гены могут быть однокопийными, а у других дублированными, то паралогия никогда не может уверенно исключаться из набора данных по конкретному гену и, следовательно, не может не исказить филогенетические оценки. По этим причинам из ядерных генов излюбленным объектом являются гены, структура которых подвергается периодической гомогенизации, например, гены рРНК. Кроме того, рибосомные гены длинные – есть надежда получить надежный филогенетический сигнал.

Множество трудностей связано с тем, что разные участки одного и того же гена могут изменяться с разной скоростью и, что, хуже всего, не независимо, а сцепленно с какими-то определенными локусами. Такие гены способны дать самые непредсказуемые результаты в случае филогенетического анализа. Поэтому довольно часто лучшие (наиболее разумные и объяснимые) результаты дает комбинированный анализ данных не по нескольким полным генным последовательностям, а по отдельным участкам многих генов. Наилучший результат от сравнительного анализа полных геномов тоже сомнителен, поскольку его можно ожидать только при условии преобладания филогенетически значимых мутаций над многими повторными и обратными заменами (филогенетическим «шумом») в быстро изменяющихся участках генома. Так, на расшифровку полных митохондриальных геномов возлагали большие надежды, полагая, что их сопоставление явится филогенетическим инструментом невиданной мощи, поскольку обеспечит большое количество признаков для анализа (Ursing, Arnason, 1998). Но очень скоро оказалось, что филогении, построенные по полным митохондриальным геномам могут содержать крупные ошибки (Naylor, Brown, 1998). Отмечена неадекватность митохондриальных геномов для определения эволюционных отношений и

времен дивергенции отрядов и надотрядных группировок плацентарных (Showers, 2002). Поэтому некоторые авторы настаивают на том, что данные по полной мтДНК никогда не должны объединяться с наборами других данных в комбинированном филогенетическом анализе (Gatesy, 2001).

### **Нуклеотидные замены и различия нуклеотидного и аминокислотного состава**

Показано, что в некоторых таксонах филогенетический сигнал в генах рРНК может быть искажен резким сдвигом доли оснований АТ или GC (Hasegawa, Hashimoto, 1993). В связи с этим сначала было предположено, что филогении, реконструированные по аминокислотным последовательностям белков, обеспечивают более надежную информацию. Но в дальнейшем оказалось, что сдвиг нуклеотидного состава ДНК может приводить также к сдвигу и аминокислотного состава, чем вызывает изменение результатов филогенетического анализа и по белковым данным (Foster, Hickey, 1999).

Результаты проведенных в последнее время статистических тестов подчеркивают сильно отличающийся от других плацентарных нуклеотидный состав мтДНК у ежей, приматов и мышеобразных грызунов (Waddell et al., 1999a, b; Schmitz et al., 2002).

На деревьях, реконструированных по мтДНК, еж занимает базальное положение относительно плацентарных, нарушая монофилию Eulipotyphla (Krettek et al., 1995; Mouchaty et al., 2000; Arnason et al., 2002). Однако аминокислотный состав кодируемых мтДНК 12 белков ежа сильно отличается от среднего для 44 видов млекопитающих (Nikaido et al., 2003a). Результаты анализа этих данных по методу наибольшего правдоподобия прямо зависели от допущений принятой в нем статистической модели: поддержка базального положения ежа (по сравнению с гипотезой Eulipotyphla) несколько уменьшалась, если принималась во внимание гетерогенность скоростей замен в сайтах (Nikaido et al., 2001; 2003a). Учитывая данные по яДНК (Murphy et al., 2001a, b) и полагая, что модель гетерогенности скорости замен в сайтах наиболее реалистична (Yang, 1996), базальное положение ежа представляется артефактным следствием высокой скорости нуклеотидных замен и сдвинутой аминокислотной композиции митохондриальных белков, а также гетерогенности скоростей замен в сайтах.

Во всех филогенетических реконструкциях, основанных на мтДНК, антропоидам соответствует очень длинная ветвь, а долгопяты и лори объединяются в одной монофилетической группе и вне остальных приматов. Это объясняется сдвигом нуклеотидного состава у антропоидов по сравнению с другими плацентарными. Ускорение несинонимичных замещений в мтДНК высших обезьян независимо отмечено по генам COII, (Adkins et al., 1996), COI (Andrews, Eastal, 2000) и *cytb* (Andrews et al.,

1998) и связано с увеличением доли С- и уменьшением доли А- и Т-оснований. Соответственно у высших обезьян аминокислотный состав мтДНК основан преимущественно на увеличении частот оснований G+C, в то время как у долгопята и лори, также как у большинства других плацентарных, он основан на основаниях А+Т. Корреляционный анализ аминокислотного и нуклеотидного состава по всем позициям кодонов и отдельно только по третьей (молчащей) позиции показал высокую корреляцию между ними (Schmitz et al., 2002). Эти результаты позволили авторам сделать вывод о том, что у приматов различия в аминокислотном составе разных таксонов есть результат сдвига нуклеотидного состава вследствие направленного мутационного давления, а не положительного отбора.

Из всех проанализированных к настоящему времени грызунов, последовательности мтДНК крысы и мыши изменяются наиболее необычно, в то время как мтДНК морской свинки имеет самый типичный характер нуклеотидных замен. Это хорошо согласуется с исследованиями репарационных процессов ДНК, которые показали, что у некоторых мышинных замедлены или неэффективны механизмы репликации и репарации ДНК (Holmquist, Filinski, 1994; Karlin, Mrazek, 1997). По теории нейтральности (Кимура, 1985) это должно приводить к различию в эволюции последовательностей. Самый простой механизм сдвига аминокислотного состава — изменение относительной скорости мутирования в некоторых парах нуклеотидов. Для мтДНК мышинных отмечены сдвиги нуклеотидных частот сравнительно с другими плацентарными в сторону С/Т (Karlin, Mrazek, 1997). Существуют предварительные данные такого же рода по яДНК (Holmquist, Filinski, 1994; Op het Veld et al., 1997). Показано, что степень сдвига нуклеотидного состава Muridae в сторону С/Т такая же, как у сумчатых (Phillips et al., 2001).

Таким образом, факт композиционной пластичности мтДНК у плацентарных установлен, хотя полная картина для разных таксонов пока остается неясной. Предполагаемые причины касаются в основном таких мутационных механизмов, как повреждение и репарация ДНК и ошибки репликаций. Однако ясно, что пластичность нуклеотидного и аминокислотного состава, усиленная неадекватностью размера выборки таксонов, может приводить к ошибочным реконструкциям филогении и неправильным датировкам. К сожалению, эти эффекты игнорируются большинством современных методов построения молекулярных деревьев.

### **Эффект притяжения длинных ветвей**

Следствием резко выраженного различия в характере и скорости нуклеотидных замен и существенного сдвига нуклеотидного состава мтДНК чаще всего оказывается эффект

притяжения длинных ветвей (ПДВ). Это выражается в группировании отдаленных ветвей друг с другом независимо от их филогенетической близости (Hillis, 1996; Swofford et al., 1996). Например, когда используется слишком отдаленная внешняя группа, наиболее быстро эволюционирующий таксон «притягиваются» длинной ветвью этой внешней группы и искусственным образом ответвляется раньше, что искажает его родственные связи. Считается, что использование эволюционных моделей, подразумевающей равенство скоростей эволюции в разных сайтах, увеличивает эффект ПДВ (Sullivan, Swofford, 1997, Yang, 1996).

Примером эффекта ПДВ служит положение ежа на деревьях мтДНК. Число нуклеотидных замен в ветви ежа самое большое. Самая длинная ветвь ежа притягивается еще более длинной ветвью *Monotremata* или *Marsupialia* и искусственным образом ответвляется раньше, что не отражает его родственные связи. Заметим, что ПДВ ежа, муридных грызунов и при использовании *Monotremata* или *Marsupialia* как внешней группы характеризует деревья, полученные не только по мтДНК, но и по нуклеотидным и белковым последовательностям ядерного гена *BRCA1* (Madsen et al., 2001; Waddell et al., 2001).

В филогенетическом анализе *Paenungulata* (отряды *Hyracoidea*, *Proboscidea*, *Sirenia*), выполненном методом наибольшего правдоподобия по данным секвенирования митохондриальных генов 12S рРНК, 16S рРНК, тРНК<sup>val</sup> и *cytb*, высокую статистическую поддержку получила группировка даманов и сирен (клада *Hiracoidea+Sirenia*), в то время как на древе ядерных генов сирены группируются не с даманами, а со слонами (клада *Proboscidea+Sirenia*). Последняя имеет невысокую статистическую поддержку (Amrine, Springer, 1999), но согласуется с морфологическими данными (McKenna, 1975). Из ранее исследованных молекулярных структур одни поддерживают монофилию группировок *Hiracoidea+Proboscidea*, другие — группировку *Hyracoidea+Sirenia* (De Jong et al., 1981; Stanhope et al., 1998). В случае митохондриальных последовательностей тест относительных скоростей эволюции в разных ветвях древа (*relative rate test*, RRT) в присутствии внешней группы, состоящей из трубкозуба и прыгунчика, показал, что число замен в ветви слонов значительно выше, чем в ветви сирен, а ветвь даманов имеет достоверно больше замен, чем ветвь сирен. В случае ядерных генов, наоборот, RRT показал, что ветвь даманов достоверно длиннее и ветви слона и ветви сирен, а те, в свою очередь, достоверно не отличаются друг от друга. Таким образом, в данном случае более длинная ветвь даманов как бы притягивается самой длинной ветвью внешней группы, т.е. наиболее быстро эволюционирующий таксон искусственным образом ответвляется раньше, что не всегда отражает его родственные связи. Неудача в получении высоко

достоверных независимых данных в пользу той или иной гипотезы связана с различной скоростью нуклеотидных замен в разных филогенетических линиях и ПДВ.

### **Внешняя группа**

В современных филогенетических реконструкциях для «укоренения» древа используется внешняя группа. Степень удаленности используемых внешних групп также влияет на результаты филогенетического анализа.

Так, исследование 12 из 13 кодирующих митохондриальных последовательностей у 22 видов млекопитающих из всех современных отрядов Eutheria, а также Marsupialia и Monotremata показал, что сумчатые и однопроходные составляют единую кладу относительно плацентарных (Janke et al., 1997). Эта реконструкция существенно отличается от классической точки зрения: возможная причина состоит в том, что в качестве внешней группы использован весьма отдаленный организм – *Xenopus* (Amphibia). Кроме того, в разбираемой работе применяется модель равнотемповых изменений в сайтах, что приводит к тенденциозности филогенетической гипотезы и увеличивает эффект ПДВ (Sullivan, Swofford, 1997).

### **Длина анализируемой последовательности, число и разнообразие таксонов**

Статистическая достоверность тех или иных группировок на деревьях зависит от длины анализируемой последовательности, объема выборки и разнообразия таксонов.

Например, показано, что изменение числа таксонов, включенных в анализ генов 12S-16S РНК, сильно меняет статистическую поддержку группировок (Douady et al., 2002). При анализе полного митохондриального генома Chiroptera в сравнении с другими представителями Laurasiatheria увеличение числа таксонов Chiroptera результативалось в возрастании бутстрэп-поддержка клады Scrotifera (Laurasiatheria без Eulipotyphla) (Lin, Penny, 2001). У грызунов по гену IRBP одними авторами (Huchon et al., 2002) обнаружено родство бобров и гоферов (Castoridae+Geomyoidea), но результаты секвенирования того же гена в другом исследовании дали иной результат: гоферы группируются с Hystricognathi, а бобры — с Sciuroidea и мышеобразными (DeBry, Sagel, 2001). Возможно, это противоречие объясняется именно недостаточной выборкой таксонов во втором случае: отсутствуют Anomalurogna, которые в филогенетическом анализе анализируются либо с *Castor+Geomyidae*, либо с мышеобразными.

Считается, что, чем анализировать много разных коротких последовательностей или одну длинную, но всего для нескольких видов, лучше увеличить выборку видов, т.к. при этом возрастает репрезентативность данных (Lecointre et al., 1993) и уменьшается эффект

притяжения длинных ветвей (Hillis, 1996). Однако довольно часто в случае слабо разрешенных деревьев статистическую достоверность той или иной топологии можно повысить, анализируя более длинные последовательности.

Заключение о том, что служит потенциальным источником ошибок в филогенетических исследованиях — недостаточный объем выборки или малая длина последовательности, было проверено компьютерным моделированием по трем основным параметрам: число образцов, скорость эволюции и длина гена на материале из всевозможных геномных баз данных (Rosenberg, Kumar, 2001). При использовании максимально возможного или в разной степени сокращенного количества образцов, деревья, полученные на основании разных методов (максимальной экономии, максимального правдоподобия и ближайшего связывания) имели одинаковое число филогенетических ошибок по внутренним узлам. Авторы этой работы полагают, что для усиления достоверности филогенетических выводов увеличение длины последовательности важнее, чем расширение набора секвенированных образцов.

К тому же выводу пришли исследователи филогении Lemuridae: выясняя взаимоотношения видов в роде *Eulemur*, авторы пытались повысить весьма проблематичное разрешение клад дерева путем изменения набора видов или/и числа признаков (Yoder, Irwin, 1999). Было обнаружено, что комбинированные генные последовательности (полный ген *cytb*, COII и D-петля) более устойчивы к изменениям размера выборки, чем наборы данных по какому-либо одному гену. Это означает, что увеличение числа признаков стабилизирует филогенетическое древо. И хотя в цитируемой работе взаимоотношения *Eulemur* так и остались неясными, приходится признать, что когда филогенетика млекопитающих сталкивается с короткими внутренними ветвями дерева и неразрешенной топологией при исчерпывающем для данной группы количестве таксонов, единственный альтернативный путь решения проблемы заключается в привлечении дополнительных признаков.

## ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Существенно больший объем генома, по сравнению со структурными генами, приходится, по-видимому, на селективно нейтральные повторяющиеся последовательности, — тандемные и диспергированные.

### **Тандемные повторы**

К тандемным принадлежит сателлитная ДНК (стДНК) которая составляет от 10 до 20% генома млекопитающих. Степень повторяемости элементов может достигать более  $10^6$  копий на геном. Располагается стДНК в гетерохроматиновых участках центромер, т.е.

в функционально неактивной области (Беридзе, 1982). Функции высокоповторяющейся ДНК дискуссионны, но основное положение о сателлитах как о «мусорной» или «эгоистической» части генома (Orgel, Crick, 1980) теперь поколеблено (Оловников, 1996; Dimitri, Junakovic, 1999). Их упорядоченная структура сохраняется благодаря т.н. «концертной эволюции», под которой понимается способ эволюционирования tandemных последовательностей, определяемый взаимодействием различных механизмов молекулярного драйва: неравного кроссинговера, геной конверсии, транспозиции, репликационного проскальзывания и РНК-опосредованной передачи генетической информации (Dover, 1982; 1986). В результате амплификации отдельных элементов или блоков из нескольких элементов повторов и быстрого распространения мутаций по геному происходит гомогенизация семейств повторов. Поэтому стДНК — одна из наиболее динамичных частей генома.

Возможности стДНК как филогенетического инструмента используются недостаточно, что, возможно, связано с обаянием концепции «эгоистичности». Довольно подробно изучена эволюция стДНК в отряде Artiodactyla (Pech et al., 1979; Jobse et al., 1995; Modi et al., 1996). Видоспецифичность оленьих и бычьих сателлитов представляет интерес в качестве видового идентификационного теста. Например, гибридизация оленьего сателлита CCsatIII с ДНК косули (*Capreolus pygargus*), северного оленя (*Rangifer tarandus*), белохвостого (*Odocoileus virginianus*) и чернохвостого (*O. hemionis*) оленей, но отсутствие гибридизации с ДНК других видов свидетельствует в пользу принадлежности косули к подсемейству американских оленей Odocoileinae (Buntjer et al., 1995).

Блот-гибридизацию проб стДНК применяли для изучения межвидовых связей китообразных, оленей и мозолоногих (Arnason et al., 1984; Arnason et al., 1988; Bogenberger et al., 1987; Vidal-Rioja et al., 1994). Полученные результаты соответствуют морфологическим данным. Интерес представляют данные о стДНК ластоногих (Pennipedia): некоторые сателлиты, найденные у тюленей, гибридизуются с сателлитами куньих (Mustelidae), но не других Carnivora, т.е. подтверждается предположение о филогенетической связи ластоногих с мустелоидной ветвью наземных хищных (Arnason, Wiedegren, 1986).

Видовая и родовая специфичность стДНК доказана многими авторами на разных грызунах (Miklos, 1985; Dod et al., 1989; Челомина и др., 1990; 1998; Потапов, Рысков, 1993; Потапов и др., 1999), насекомоядных (Банникова и др., 1995; 1996), парнокопытных (Медников и др., 1995), приматах (Fedorova et al., 1999) и рукокрылых (Матвеев и др., 2000).

В целом, наличие общих сателлитов у близких видов, видимо, распространенное явление, но большая скорость эволюции сДНК может результироваться в так называемой «звездной» филогении (Bachmann et al., 1993). Подробное использование сателлитов в качестве эволюционных маркеров и многочисленные развернутые примеры этих исследований по разным группам млекопитающих и других позвоночных изложены в обзоре Гречко (2002).

### Диспергированные повторы

Диспергированные, т.е. рассеянные по геному в виде отдельных копий, короткие и длинные повторы (ретропозоны), повторяющиеся с частотой  $10-10^4$  копий на геном, известны соответственно как SINEs (short interspersed elements) и LINEs (long interspersed elements).

LINEs – это ретропозоны размером 3-7 т.п.н., которые транскрибируются РНК-полимеразой II. В геномах млекопитающих они присутствуют с момента дивергенции сумчатых и плацентарных, т.е. более 100 млн. лет, и составляют не менее 10% генома (Burton et al., 1986; Hardison, Miller, 1993). LINEs млекопитающих подвергаются амплификации, в ходе которой множественные копии этих элементов рассеиваются по геному. Эта амплификация может быть обнаружена и датирована. Поскольку структура семейств длинных ретропозонов размывается со временем, LINEs в большей степени пригодны для изучения тех событий в эволюции млекопитающих, которые произошли не более 25-50 млн. лет назад. Но исследование их общего строения позволяет выделять и относительно недавние видообразовательные события (Usdin et al., 1995).

Так, у грызунов с помощью LINEs установлены сестринские взаимоотношения родов *Microtus* и *Clethrionomys* и монофилия настоящих леммингов, показано малое число синапоморфий, объединяющее роды подсемейства Arvicolinae (Modi, 1996), что обуславливает политомию этого подсемейства, позднее подтвержденную секвенированием мтДНК (Congroy, Cook, 1999). Другие серьезные проблемы в систематике грызунов также решены с помощью семейства LINEs L1: роды *Acomys*, *Lophuromys* и *Uranomys* выведены из подсемейства Murinae, к которому отнесен род *Otomys* (Usdin et al., 1995). Однако обнаруженная недавно возможность горизонтального переноса транспозонных элементов в том числе переноса элемента LINE BovA от рептилий к предкам жвачных (Kordis, Gubensek, 1998) означает, что и эти маркеры имеют свои ограничения. Впрочем, такого рода данные нуждаются в подтверждении.

SINEs — короткие ретропозоны длиной 80-400 п.н., число копий варьирует от  $10^3$  до  $10^5$  на геном, причем вид может иметь несколько семейств SINEs в своем геноме. SINEs

транскрибируются РНК-полимеразой III, образуящиеся низкомолекулярные РНК, видимо, могут подвергаться обратной транскрипции, давая в некоторых случаях новые копии SINEs. Подавляющее большинство семейств SINEs ведет свое происхождение от генов класса III, которые кодируют малые цитоплазматические РНК, например тРНК и 7SL-РНК, что было установлено по наличию сходства нуклеотидных последовательностей тРНК и головной части SINEs. Хвостовая часть SINEs обычно образована А-богатой последовательностью, тогда как головная и центральная часть совершенно различна у SINEs разных семейств (Крамеров, 1987; Okada, 1990). Фактически сразу после их открытия была показана их таксонспецифичность разного уровня (Singer, 1982). Всего из геномов млекопитающих сейчас описано более 10 семейств SINEs, которые активно применяются в качестве филогенетических маркеров.

Наличие в геноме семейства SINEs является «совершенной синапоморфией» — надежным маркером клады эволюционного древа. Причина в том, что, однажды возникнув в стволовой линии, семейство SINEs передается всем последующим ветвям этого древа (Крамеров и др., 1980; Крамеров, 1987; Shimamura et al., 1997; Serdobova, Kramerov, 1998; Kramerov et al., 1999; Nikaido et al., 1999; Shedlock, Okada, 2000).

Не менее надежный синапоморфный признак — это наличие отдельных копий SINEs в определенных локусах генома (инсерции). Предполагается, что инсерции SINEs свободны от конвергенций и реверсий, т.е. вероятность возникновения точно такой же вставки дважды в одном и том же месте генома ничтожно мала. Во всяком случае, не известны механизмы таких процессов (Shedlock and Okada, 2000), поэтому считается, что филогенетический сигнал этих маркеров не теряется в шуме гомоплазий.

Таким образом, филогенетическая ценность SINEs определяется тем, что 1) присутствие в ДНК разных видов одного и того же семейства SINEs может быть результатом только их общего происхождения, т.е. является апорфным признаком; 2) встраивание этих генетических элементов в геном необратимо; 3) в отличие от LINEs, они распространяются в геномах путем только вертикальной передачи. Все это определяет ценность SINEs как кладистических маркеров видообразования (Miyamoto, 1999; Shedlock, Okada, 2000). Многие исследователи указывают теперь на необходимость тестирования любых филогенетических гипотез помощью SINEs (Waddell et al., 2001; Lin et al., 2002).

Всех млекопитающих объединяет присутствие в их геномах одного из самых древних семейств SINEs — MIR (mammalian interspersed repeat) с  $10^5$  копиями (Jurka et al., 1995; Smit, Riggs, 1995). Это одно из самых древних среди известных семейств SINEs, о чем свидетельствует широкий круг распространения и очень большая (вплоть до 50%)

дивергенция его копий. Последний факт также указывает на то, что, в отличие от других известных SINEs, MIR уже довольно давно перестал амплифицироваться. Видимо, вследствие древности полноразмерные копии MIR длиной 260 п.н. встречаются редко. Как правило, копии лишены одного или обоих концов и значительное их большинство, по неполне понятным причинам, представлено только центральным участком (CORE-последовательность) длиной около 70 п.н. В SINEs даже самых далеких таксонов, от растений до млекопитающих, обнаружена некая консервативная последовательность – так называемая CORE-SINE, которая является фрагментом элемента MIR и возраст которой оценивается в 550 млн. лет (Gilbert, Labuda, 2000).

Первым элементом из CORE-SINEs, имевшимся именно у млекопитающих был, видимо, Ther-1 (theria). Затем по мере разделения однопроходных, сумчатых и плацентарных образовывались специфичные для них генетические элементы. Когда однопроходные отделились от общего ствола сумчатых и плацентарных, т.е. более 170 млн. лет назад (Kumar, Hedges, 1998), возникло семейство CORE-SINEs – Mon-1. Отделению линии сумчатых 130 млн. лет назад сопутствовала амплификация двух специфичных для этой линии семейств CORE-SINEs – Mar-1 и Oro-1. Семейство Mon-1 маркирует яйцекладущих, семейства Mar-1 и Oro-1 – сумчатых. В линии плацентарных возникло семейство Ther-2, после чего никаких новых семейств CORE-SINEs у млекопитающих уже не возникало. Амплификация CORE-SINEs Ther-1 и Ther-2 могла прекратиться до (110-80 млн. лет назад) или вскоре после (65 млн. лет назад) радиации плацентарных.

Три группы насекомоядных – Soricidae, Talpidae и Erinaceidae — маркируются специфическими для них SINEs: SOR, TAL, ERI-1 и ERI-2 (Borodulina, Kramerov 2001). Семейство коротких ретропозонов VES (Borodulina, Kramerov, 1999) найдено в геномах всех Microchiroptera, кроме Rhinolophoidea (Kawai et al., 2002), что указывает на обособленность последних.

Распространение в геномах грызунов генетических элементов B1, B2, ID, DIP и B1-dID (Kramerov et al., 1999) подтверждает филогению, разработанную на основании морфологических и палеонтологических признаков, и согласуются с некоторыми другими молекулярными данными (Nedbal et al., 1996). Элемент B1 (7SL РНК родственный SINE) (Krayev et al., 1980) имеется в геномах всех грызунов. В яДНК грызунов из семейств Muridae, Cricetidae и Spalacidae содержится большое число копий ретропозона B2 (тРНК-родственный), (Krayev et al., 1982; Serdobova, Kramerov, 1998), тогда как в геномах Dipodidae, Zapodidae, Gliridae, Sciuridae, Hystricidae и Caviidae этот SINE не представлен даже одиночными копиями. Круг видов, несущих в своих геномах элемент DIP,

гомологичный элементу B2, ограничен семействами Dipodidae и Zapodidae. Отсутствие в геноме морской свинки и сони ретропозонов типа B2 и DIP говорит о том, что семейства Caviidae и Gliridae отделились от остальных грызунов до возникновения у них этих элементов. В геномах сони и белки найден элемент BI-dID, состоящий как из последовательностей B1, так и ID, который в меньшем количестве и с несколько иной последовательностью имелся также у бобра, дикобраза и морской свинки, но совсем отсутствовал у мышей, полевок, тушканчиков, мышовок и слепышей (Kramerov et al., 1999). Распространение и количественные соотношения элемента BI-dID показали, что Gliridae и Sciuridae имеют общее происхождение и соневые, следовательно, не принадлежат к миоморфным грызунам, как это предполагалось ранее (Romer, 1966).

Одно из первых удачных применений инсерций SINEs для изучения филогении млекопитающих – обнаружение специфичного короткого ретропозона, общего для китообразных, бегемотов и жвачных (Shimamura et al., 1997; Shedlock, Okada, 2000). Кладу, объединяющую китообразных с бегемотами, поддерживают 4 синапоморфии SINEs из семейства CHR-1; другие 4 инсерции этого SINE и одна инсерция LINE семейства ARE также свидетельствуют в пользу парафии парнокопытных (Nikaido et al., 1999). Возраст повтора ARE составляет не менее 25 млн. лет, т.е. появление его совпадает с дивергенцией парнокопытных и китообразных (Alexander et al., 1995). Семейства SINEs Bov-A2 и Bov-B, характеризующие подотряд жвачных парнокопытных (Ruminantia), и повтор SSPRE, маркирующий семейство свинных (Suidae), значительно моложе (Yasue, Wada, 1996).

Однако и при использовании стДНК и повторов типа LINEs и SINEs как филогенетических маркеров имеются потенциальные источники ошибок. Первый из них – случайное вымывание (или фиксация) одного из аллелей в результате дрейфа генов при небольшом эффективном размере популяции, что может наблюдаться в случае очень близких во времени событий видообразования (Tachida, Iizuka, 1993). Преодоление этой проблемы заключается в изучении распространения не одной, а многих инсерций для доказательства монофилии таксонов.

Второй источник ошибок – утрата информации в результате мутационного «разваливания» данного повтора в результате рекомбинаций и она выше для далеких, давно дивергировавших таксонов. Поэтому эффективное восстановление филогений по распространению инсерций ограничено таксонами с не более, чем 25%-ым различием последовательностей и разошедшимися менее 50 млн. лет назад.

Наконец, нельзя, повидимому, исключить и возможности гомоплазии. Подтверждение этого неприятного заключения содержится в работе по SINEs хищных (Slattery et al.,

2000), где у Felidae найдены спорадические инсерции в интроне гена Smcy, не связанные с дивергенцией видов. В роде *Felis* только геном *F. silvestris* имел SINE в интроне Smcy. Но такой же генетический элемент в том же локусе с идентичными фланкирующими участками был найден в геноме *Lynx rufus*, – вида, достаточно отдаленного от рода *Felis*, что очень походит на инсерцию по одинаковым фланкирующим последовательностям. Если так, то инсерции SINEs в идентичных сайтах у разных видов могут быть не связаны с их филогенией, что противоречит гипотезе о неподверженности SINEs конвергенциям (Nikaido et al, 1999).

### МУЛЬТИЛОКУСНЫЕ МАРКЕРЫ ДНК В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

В основе всех филогенетических схем, выстроенных по последовательности каких-либо генов или некодирующих элементов, лежит секвенирование ДНК, которое позволяет проводить прямое сравнение полных или частичных нуклеотидных последовательностей. Методикам и проблемам секвенирования посвящена обширная литература, в т.ч. книга Чемериса с соавт. (2000). Это, конечно, лучшее из арсенала средств молекулярной филогенетики; но и оно имеет свои ограничения. Самое важное из них заключается в том, что результаты, основанные на анализе единственного генного локуса, представляют собой данные об эволюции только этого локуса и могут не совпадать с данными для другой последовательности того же генома и слабо отражать историю вида в целом. Для получения высокоразрешенных филогенетических деревьев, теперь ясно, недостаточно одного гена, а требуются комбинированные последовательности из нескольких.

Другой способ обойти эту проблему состоит в использовании *мультилокусного анализа*, который позволяет сканировать мутации по всему геному и сопоставлять более или менее протяженные его куски. Это дает возможность сравнивать не один конкретный ген, а многие, но анонимные последовательности с неизвестными функциями и часто неясной локализацией. Преимущества мультилокусных маркеров состоят в анализе значительно большей и, что особенно важно, — различной в функциональном плане части генома.

В последующих разделах изложены некоторые, наиболее широко известные методы мультилокусного анализа, а в таблице 1 приведены границы их применения.

### Гибридизация ДНК×ДНК

Молекулярная гибридизация ДНК – это метод, позволяющий оценить степень общего сходства ДНК у разных организмов при попарном сравнении. На молекулярной гибридизации всей геномной ДНК или отдельных ее фракций основаны самые первые

работы по геносистематике (Медников, 1980; Sibley et al., 1984). В современной молекулярной филогенетике этот метод практически вышел из употребления вследствие низкой разрешающей способности, трудностей с воспроизводимостью результата и, следовательно, неоднозначной интерпретацией данных. Однако все же можно указать некоторые работы, где молекулярная гибридизация ДНК в современной модификации, предусматривающей ужесточение условий реакции, была применена для оценки родства таксонов млекопитающих. Например, с помощью гибридизации ДНК была изучена молекулярная эволюция муридных грызунов (Catzeflis et al., 1992; 1995), выявлена парафилия рода рыжих полевок *Clethrionomys* относительно скальных полевок *Alticola* (Гилева и др., 1990), уточнены филогенетические связи новозеландских летучих мышей *Mystacinidae* с другими рукокрылыми, установлена близость этого вида к рыбоядным летучим мышам *Noctilionidae* (Kirsch et al., 1998).

В современных сравнительно-молекулярных исследованиях более популярен метод гибридизации по Саузерну (Sambrook et al., 1989). Его можно использовать как для идентификации последовательностей в гидролизатах суммарной ДНК, так и для локализации специфических последовательностей в клонированной ДНК. Он получил очень большую популярность и открыл целое направление в сравнительном анализе геномов. С помощью гибридизации по Саузерну проведены, например, удачные сравнения стДНК нескольких десятков видов парнокопытных из семи семейств (Modi et al., 1996), изучены дивергенция повторов ДНК и таксоноспецифичность сателлитных семейств у *Cervidae* и *Bovidae* (Lima-de-Faria et al., 1984; Buntjer, 1997).

### **Рестриктазный анализ**

Рестриктазный анализ выявляет изменения в длине фрагментов геномной ДНК, возникающие при расщеплении специфическими ферментами рестрикции, поэтому этот метод называют еще методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). К потере участков узнавания рестриктаз приводят вариации в последовательности геномной ДНК, вызванные точковыми нуклеотидными заменами, а также инверсиями, делециями и инсерциями.

Широкое распространение получил рестриктазный анализ митохондриальной и нефракционированной геномной ДНК. К числу модификаций последнего относится разработанный отечественными учеными метод таксономического «фингерпринта» ДНК, или *таксонпринт* (Федоров и др., 1992; Grechko et al., 1997; Fedorov et al., 1999). Признаки в таксонпринте могут быть подразделены на два типа: вариабельные и невариабельные. К вариабельным относятся видоспецифичные или специфичные для групп близких видов

рестриктные фрагменты. Природа вариабельных таксонпринтных фрагментов доказана секвенированием, это сателлитная ДНК (Рудых и др., 2002). Таким образом, таксонпринт способен выявить степень межвидовой дивергенции стДНК, без таких трудоемких этапов анализа, как клонирование и секвенирование. Невариабельные фрагменты объединяют представителей одного рода или семейства. Каждый таксон может быть охарактеризован набором таких полос. Показано, что невариабельные таксонпринтные полосы, по крайней мере в геноспектрах приматов, соответствуют фрагментам диспергированных Alu- и L1-повторов (Fedorov et al., 1999).

Замечательно, что в подавляющем большинстве случаев в таксонпринте отсутствует индивидуальная и межпопуляционная изменчивость, что дает возможность оперировать единичными экземплярами исследуемых животных, не прибегая к анализу больших выборок.

Таксонпринт принципиально отличается от рестриктазного анализа уникальных участков геномной ДНК или мтДНК. Согласно распространенному мнению (Swofford et al., 1996) рестрикционные фрагменты генома не являются независимыми признаками и поэтому их нельзя использовать в филогенетическом анализе. Однако данная критика рестриктазного анализа не распространяется на метод таксонпринта, т.к. существуют принципиальные различия между свойствами рестрикционных фрагментов однокопийных участков генома и высококопийных повторов. Точечные мутации не могут возникать синхронно в одних и тех же сайтах в тысячах копий диспергированных повторов. Следовательно, они не могут привести к спонтанной замене одной невариабельной таксонпринтной полосы на другую (Fedorov et al., 1999). Кроме того, возможность заметить мутацию в повторяющейся ДНК методом таксонпринта необходимо связана с распространением этой мутации по всем копиям тандемного повтора, т.е. с амплификационным событием, вероятность которого, соответствует вероятности видообразования. Следовательно, маркеры таксонпринта более надежны, чем маркеры рестриктазного анализа однокопийной ДНК.

Среди млекопитающих методом таксонпринта исследованы родственные связи в группах парнокопытных, грызунов (Рысков и др., 1994; Потапов и др., 1999), насекомоядных (Банникова и др., 1995; 1996; Bannikova et al., 2002) и рукокрылых (Матвеев и др., 2000).

## **RAPD-PCR**

Из молекулярных маркеров, основанных на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР), наиболее известен и популярен RAPD-PCR (random amplified polymorphic

DNA in polymerase chain reaction). В ПЦР определенная последовательность ДНК в течение нескольких часов умножается *in vitro* в количестве, превышающем исходное в  $10^8$  раз. Метод RAPD-PCR позволяет разнонаправленно в каждой цепи амплифицировать участки ДНК, ограниченные последовательностью, комплементарной случайному праймеру — искусственно синтезированной олигонуклеотидной последовательности (Williams et al. 1990; Welsh, McClelland, 1990; Welsh, McClelland, 1991).

Число работ, выполненных по этой методике, необъятно, хотя относящихся именно к млекопитающим, меньше, чем к другим животным. Один из примеров удачного и адекватного использования этой методики для межвидовых сравнений млекопитающих — исследование систематики эндемичных африканских грызунов видового комплекса *Lophuromys flavopunctatus* (Lavrenchenko et al., 2001). Полученные результаты указывают на древнюю дивергенцию афроальпийских видов и недавнее происхождение лесных видов этой группы.

## Inter-SINE-PCR

В классическом варианте ПЦР осуществляют с праймерами, направленными на известную олигонуклеотидную последовательность – специфичная ПЦР. Один из ее вариантов — inter-SINE-PCR, или IS-PCR (Jurka et al., 1995) – анализ полиморфизма длин участков ДНК, ограниченных копиями SINEs, находящимися на расстоянии 100-1000 п.н. друг от друга. Отличия от RAPD заключаются в использовании специфичных и длинных праймеров, а также разделении радиоактивно меченых продуктов амплификации в денатурирующем сиквенсовом геле, что значительно повышает разрешающую способность метода. Длинные специфичные праймеры позволяют повысить температуру их присоединения, что увеличивает воспроизводимость при одновременном увеличении информативности.

Впервые полиморфизм длины участков ДНК, фланкируемых короткими диспергированными повторами, был исследован при изучении Alu-полиморфизма в геноме человека (так называемая Alu-PCR, или IRS-PCR, Nelson et al., 1991). Позже этим способом был исследован полиморфизм других коротких диспергированных повторов в отряде млекопитающих Artiodactyla (Kaukinen, Varvio, 1992). Опыт использования MIR-полиморфизма (inter-MIR-PCR) для изучения филогении и систематики млекопитающих включает парнокопытных (Buntjer, 1997), насекомоядных и рукокрылых (Банникова и др., 2002) и грызунов (Брандлер, 2003).

## ISSR-PCR

ISSR-PCR (inter-microsatellite-PCR) – это амплификация участков ДНК, фланкируемых микросателлитами (Zietkiewicz et al., 1994). *Микросателлиты* (МС), или простые повторы (simple sequence repeats) — это сателлитные последовательности с длиной мономера порядка единиц нуклеотидов и числом повторов около 30 и менее. Каждый микросателлитный «островок», независимо от его мотива, представляет высокополиморфный полиаллельный генетический локус с высокой информативностью. Некоторые МС могут быть сцеплены с генами (например, участвовать в связывании белков рекомбинации в соответствующих сайтах хроматина) и тем самым находиться под давлением отбора, но большинство МС эволюционируют нейтрально.

Метод ISSR-PCR в филогенетике используется, главным образом, на уровне близкородственных видов. Известны попытки его применения и при изучении генетических взаимоотношений и достаточно далеких видов – представителей парнокопытных и непарнокопытных (Глазко и др., 2002). Однако кластеризация антилоп с

лошадинами, а не с полорогими, к которым они относятся, говорит, видимо, о неадекватности этой методики данному таксономическому уровню.

### **Некоторые ограничения**

Методы мультилокусного анализа ДНК удобны, но имеют определенные технические и концептуальные ограничения.

Использование признаков RAPD, AFLP, IS-PCR и ISSR-PCR в филогенетическом анализе предполагает, что продукты амплификации гомологичны, независимы и переменны. Однако: 1) разные фрагменты одинакового размера при электрофоретическом анализе могут занимать одинаковое положение на геле, 2) некоторые фрагменты могут амплифицироваться до уровня ниже возможностей разрешения и, значит, не будут считаны (Smith et al., 1994), 3) возможны артефактные полосы, появляющиеся из-за неспецифичности праймеров, образование гетеродуплексов и другие ошибки (Nadryg et al., 1992; Bowditch et al., 1993). Некоторые, но не все из этих проблем могут быть преодолены технически: например, если проверять гомологичность полос гибридизацией по Саузерну, секвенированием или рестриктированием продуктов амплификации. Достоверность результата возрастает при многократном повторении опытов и использовании многих праймеров.

Единственный признак, который может быть считан с этих маркеров без дополнительного исследования, – это присутствие/отсутствие амплифицированного фрагмента ДНК. Отличить доминантную гомозиготу от гетерозиготы и рецессивную гомозиготу от неамплифицированной последовательности нельзя. Подсчитать частоты аллелей в типичном случае невозможно, в то время как монолокусные маркеры анализируются именно как аллели с частотами. Этот факт лег в основу концептуальных возражений против использования RAPD-признаков в филогенетическом анализе (Baskeljaun et al., 1995). Помимо того, анализ мультилокусных данных представляет собой одновременное сравнение геноспектров всех образцов в данном опыте. Сравнение с результатами другого опыта, вообще говоря, технически невозможно без дополнительных перекрестных опытов.

Все это, однако, не означает, что эти признаки не содержат никакого филогенетического сигнала. Просто природа мультилокусного полиморфизма до сих пор мало понятна, поэтому, следует осторожно подходить к использованию его на уровне таксонов выше родового ранга. RAPD, например, практически не применим уже и на родовом уровне из-за возрастающей ошибки негомологичности фрагментов одного размера и редкости истинно гомологичных фрагментов, т.е. синапоморфий.

Методы мультилокусного анализа ДНК проигрывают секвенированию по точности, информативности и широте сопоставлений. Однако постоянное ужесточение условий и увеличение разрешающей способности этих методик обуславливает то, что популярность связанных с ними маркеров не утрачивается.

### МОНОЛОКУСНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ

В монолокусном анализе микросателлитов (МС) мы имеем дело с ядерные маркерами, которые наследуются кодоминантно: каждый из двух аллелей локуса может быть идентифицирован и проанализирован. Это означает, что для каждого генного локуса возможно определить, является ли данный зверек гетерозиготой или гомозиготой, в чем и заключается неоспоримое преимущество этих маркеров над RAPD, IS-PCR, AFLP и ISSR-PCR. Бипарентальное наследование МС вместо унипарентального наследования мтДНК определяет достоинство этих маркеров по сравнению с митохондриальными гаплотипами.

В монолокусном МС анализе праймеры подбираются на участки, фланкирующие МС. Следовательно, амплифицируется и анализируется сам микросателлит. Поскольку фланкирующие последовательности отличаются для разных локусов, то каждая пара праймеров определяет только один определенный локус. Длины этих локусов различны, хотя последовательность одна и та же. Это и есть аллели, анализируемые в монолокусном МС анализе.

Критическая точка для анализа популяционной структуры – скорость мутаций МС, которая обычно на 1-2 порядка выше, чем у аллозимов. Высокая мутабельность и варьирование числа повторов могут приводить к гомоплазиям (когда одинаковые аллели возникают в результате разных мутаций из-за высокой мутабельности при некотором ограниченном числе аллельных состояний) и переоценке генетической дивергенции популяций (Hedrick, 1999). На примере хромосомных рас *Sorex araneus* показано, что в гибридной зоне, где миграция ограничена и генетический обмен редок, скорость мутаций в высоко полиморфных МС локусах выше, чем скорость миграций и генного обмена (Balloux et al., 2000 a, b). Кроме того, к недостаткам этих маркеров относят практическую невозможность объединения усилий разных лабораторий по изучению одних и тех же объектов, т.к. это требует применения одинаковых зондов.

Монолокусный анализ МС наиболее подходящ для внутривидовых исследований, уже видовой уровень практически исключен из рассмотрения с помощью этих маркеров. Поэтому они представляют больший интерес для популяционной генетики, чем для филогенетики.

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ДРЕВО МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Лавина исследований в области сравнительного изучения ДНК особенно мощным потоком обрушилась на филогенетику млекопитающих. Привлечение молекулярных данных, по меткому выражению Жонга (De Jong, 1998), не просто изменило, но «сотрясло» традиционное филогенетическое древо этой группы. Результаты действительно впечатляющие: анализ митохондриальных и ядерных генов отвергает достоверность многих прежних крупных группировок (таких как Ungulata) (рис. 1) и, напротив, свидетельствует в пользу таких клад, которые ранее никогда не выделялись: Afrotheria, Laurasiatheria, Euarchontoglires (рис. 2, 3). В последние годы было предпринято несколько попыток воссоздать молекулярную филогению млекопитающих на основе имеющихся данных секвенирования ядерных и митохондриальных генов (Springer et al., 1997; Stanhope et al., 1998; Madsen et al., 2001; Murphy et al., 2001a). На сегодняшний день мы имеем филогенетическую реконструкцию на основе анализа очень длинной комбинированной последовательности, составленной из многих ядерных (более 20) и нескольких митохондриальных генов (Murphy et al., 2001b; Waddell, Shelley, 2003). Полученное древо (рис. 3) наиболее полным образом отражает современные представления молекулярных филогенетиков о таксономических связях и порядке дивергенции основных таксонов плацентарных.

При сравнении результатов анализа этого древа и результатов новейшего кладистического анализа 260 морфологических признаков в 39 отрядах млекопитающих (Shoshani, McKenna, 1998) обнаруживается ряд соответствий (см. рис. 1 и рис. 3). К ним относятся: разделение Xenarthra (неполнозубые) и Pholidota (панголины) и выделение первых в самостоятельную относительно Epitheria группу; существование клад Ferae (панголины и хищные), Cetungulata (китообразные и парнокопытные) и Tethytheria (сирены и хоботные).

Наиболее противоречивый морфологической гипотезе результат – появление на молекулярно-филогенетическом древе эндемичной африканской клады Afrotheria, которая включает слонов, сирен, даманов, трубкозуба, прыгунчиков, а также тенреков (Tenrecidae) и златокротов (Chrisochloridae). Последние, следовательно, исключаются из насекомоядных (Lipotyphla) и в составе Afrotheria образуют группу Afrosoricida.

В настоящее время последние сомнения по поводу родства этих столь различных в морфологическом отношении млекопитающих, видимо, развеяны с выделением из их геномов нового специфичного семейства SINEs – AfroSINE (Nikaido et al., 2003b). Этот короткий тРНК-родственный ретропозон характеризует геномы всех афротерий и не обнаруживается у других плацентарных. В количественном отношении у дамана,

например, он составляет 7.4% генома. Знаменательно, что AfroSINE даманов, сирен и слонов содержит длинную диагностическую делецию размером 45 п.о. на участке, расположенном сразу за tPHK-родственным регионом. Это короткое подсемейство AfroSINE, названное авторами HSP, является диагностическим для Paenungulata и доказывает их монофилию. Взаимоотношения внутри Paenungulata остаются пока неясными, но, видимо, скоро разрешаться на основе анализа инсерций генетического элемента HSP.

Анализ полного митохондриального генома (рис. 2) достоверно объединяет Dermoptera (шерстокрылы) с Antropoidea (высшие обезьяны), Tarsiidae (долгопяты) и Lemuridae (лемуры) занимают базальное положение, а Scandentia (тупайи) тяготеют к грызунам, хотя и с низкой поддержкой. Комбинированный анализ 19 ядерных и 3 митохондриальных генов отвергает существование Archonta. Вместо этого приматы, шерстокрылы, тупайи, грызуны и зайцеобразные объединяются в надотрядной группировке Euarchontoglires (Murphy et al., 2001). Эта гипотеза (рис. 3) представляется наиболее правдоподобной, хотя взаимоотношения приматов, грызунов, зайцеобразных и внутри Euarchontoglires остаются пока предметом дискуссий.

Внутриотрядные филогенетические связи приматов, в частности, долгопятов и высших обезьян пока остаются противоречивыми. В анализе мтДНК приматы оказываются парафилетичны вследствие образования сестринской группы Dermoptera+Anthropoidea (рис. 2), которая находится в сестринских взаимоотношениях с Tarsiidae относительно Prosimii (лемуры и лори). Выше, однако, было отмечено, что взаимоотношения долгопятов с приматами по результатам анализа мтДНК представляют собой артефакт, вызванный сдвигом нуклеотидного и аминокислотного составов (Schmitz et al., 2002). Поэтому сестринские взаимоотношения долгопятов и высших обезьян по данным о ядерных генах, поддерживаемые тестом на наличие инсерций SINEs, более вероятны.

Все молекулярные данные сходятся в вопросе о монофилии парнокопытных и китообразных (клада Cetartiodactyla). При этом молекулярная филогенетика отводит место китообразным внутри базально радиации парнокопытных (Graur, Higgins, 1994; Shimamura et al., 1997): по результатам иммунологических сравнений (Sarich, 1993), секвенирования гена *cyt b* мтДНК (Irwin, Arnason, 1994; Montgelard et al., 1997) и анализа инсерций коротких и длинных диспергированных повторов яДНК (Nikaido et al., 1999) киты и бегемоты составляют одну кладу.

Несмотря на многочисленные исследования, не находит окончательного ответа вопрос о происхождении Rodentia (грызуны) и объединении их с Lagomorpha

(зайцеобразные) в составе группировки Glires (Lin et al., 2002). Гипотеза Glires отвергается целым рядом авторов на основе анализа мтДНК (D'Erchia et al., 1996; Janke et al., 1997; Penny and Hasegawa, 1997; Sullivan, Swofford, 1997). Отряд Rodentia тоже полифилетичен: одна его ветвь включает муридных грызунов (Muridae), а другая – всех остальных (немуридных), причем зайцеобразные образуют кластер с немуридными грызунами (Reyes, et al., 2000). На древе полной мтДНК (рис. 2) грызуны разбиваются на две ветви: миоморфных и всех остальных грызунов, а зайцеобразные входят в состав Archonta. Однако анализ частичного митохондриального генома (12S рРНК, 16S рРНК, тРНК<sup>val</sup>) (Frye, Hedges, 1995) и кДНК пепсиногенов (Narita et al., 2001) поддерживают монофилию Rodentia. При учете ядерных последовательностей грызуны достоверно составляют монофилетическую группу с зайцеобразными (Murphy et al., 2001, Huchon et al., 2002, рис. 3), что, видимо, наиболее близко к истине, поскольку соответствует морфологическим данным (Luckett, Hartenberger, 1993).

Как видно из рис. 3, комбинированный анализ ядерных и митохондриальных генов не поддерживает клады Chiroptera+Eulipotyphla, также как и результаты анализа только ядерных генов (Douady et al., 2002). Данные о полном митохондриальном геноме (Mouchaty et al., 2000б) и отдельных генах мтДНК (Arnason et al., 2002) наоборот свидетельствуют в ее пользу (рис. 2). Вопрос, возможно, нуждается в дополнительном исследовании, но низкая поддержка клады Soricomorpha+ Chiroptera (42% в анализе ML) на древе Арнсона не вызывает серьезного доверия.

Секвенирование полного митохондриального генома (Nikaido et al., 2000; 2001) и многих генов яДНК (Murphy et al., 2001; Teeling et al., 2000, 2002) позволило сделать вывод о монофилетичности Chiroptera. Однако по тем же молекулярным данным Microchiroptera в составе рукокрылых полифилетичны (Springer et al., 2001б; Teeling et al., 2002) (рис. 3). Несмотря на весомое число молекулярных признаков, по которым было сделан этот вывод, очевидно, что вопрос остается открытым, поскольку требует признания независимости возникновения в этих линиях летучих мышей очень сложного механизма эхолокации.

Насекомоядные вполне оправдали свою славу самой большой «мусорной корзины» эутерий. Выше уже говорилось о кладе Afrosoricida (тенреки и златокроты), которая по новым представлениям не имеет отношения к истинным насекомоядным (Eulipotyphla). Секвенирование 19 ядерных последовательностей (в т.ч. экзон 28-го гена vWF, A2AB, IRBP, 11-й экзон BRCA1, некодирующие последовательности APP, BMI1, CREM, PLCB4), общей протяженностью более 18 т.п.н., подтверждая полифилию Lipotyphla, тем не менее поддерживает монофилию традиционной группы Eulipotyphla (ежи, кроты и землеройки

(рис. 3). С этими данными согласуются более ранние результаты анализа гемоглобинов (Sarich, 1993). Как было отмечено выше, гипотеза о «внешнем» положении ежей относительно других плацентарных, основанная на анализе полных нуклеотидных последовательностей мтДНК (Krettek et al., 1995; Mouchaty et al., 2000a; Nikaido et al., 2001), несостоятельна.

Что касается взаимоотношений таксонов в составе Eulipotyphla, то широко распространенное представление о большей близости землероек и кротов друг к другу, чем к ежам (Douady et al., 2002), не поддерживается ни анализом комбинированной последовательности ДНК (рис. 3), ни результатами анализа аминокислотных последовательностей (Miyamoto, Goodman, 1986). Согласно этим данным ежи и землеройки составляют сестринскую группу относительно кротов. Положение *Solenodon* (щелезуб) из-за малого числа секвенированных последовательностей остается неясным. По нескольким митохондриальным генам, в т.ч. тРНК, щелезуб образует ветвь, базальную не только к остальным Eulipotyphla, но и ко всем Laurasiatheria (Waddell, Shelley, 2003). Возможно, насекомоядных ждет еще одно потрясение.

### **Надежность молекулярно-филогенетического дерева**

Не «развалится» ли новейшая на сегодняшний день молекулярно-филогенетическая реконструкция (рис. 3) под тяжестью новых молекулярных открытий? Полагаю, что нет. За это говорит солидный размер проанализированных последовательностей при очевидном перевесе экзонов яДНК: 19 ядерных генов и 3 митохондриальных при общей длине комбинированной последовательности более 16 т.п.н. для 42 представителей плацентарных млекопитающих как основных объектов анализа и двух сумчатых в порядке внешней группы. Количественное доминирование ядерных генов над генами мтДНК в анализируемом наборе данных – очень важный момент, поскольку ядерные экзоны имеют большую возможность в разрешении глубоких ветвей дерева и установлении взаимоотношений давно дивергировавших таксонов, чем митохондриальные гены (Springer et al., 2001). Не маловажно и то, что возможность артефактов минимизирована за счет отсутствия некоторых «странных» митохондриальных генов, которые включаются в анализ, когда авторы имеют дело с полными митохондриальными геномами.

Приведенные выше результаты комбинированного анализа ядерных и митохондриальных генов (рис. 3) получены при использовании адекватных моделей эволюции ДНК и здоровых статистических программ, которые позволяют извлечь максимум информации из данных секвенирования (Whelan et al., 2001). Для реконструкции дерева Мерфи с соавт. (Murphy et al., 2001b) использовали общую модель

обратимости замен с учетом гетерогенности скоростей замещения и инвариантности сайтов (GTR+Г+I), методы максимального правдоподобия, в разных его версиях. При достаточно большом количестве таксонов и последовательностей и принятой корректной модели молекулярной эволюции в данном исследовании эти методы являются самым действенным орудием для разрешения сложных филогенетических проблем.

Недавно филогенетическая реконструкция, представленная на рис. 3, была дополнена семью новыми генными последовательностями (RAG1, гамма-фибриноген, ND6, мт-тРНК, с-МЫС, GHR и эpsilon-глобин) (Waddell, Shelley, 2003), что подтвердило и усилило достоверность выделенных ранее надотрядных клад плацентарных. Помимо того, напомним, что целый ряд результатов, отраженных на этом древе, уже тестирован с помощью независимого филогенетического маркера SINEs (монофилия Cetartiodactyla, Rodentia, Paenungulata, Afrotheria).

Для решения вопроса о том, насколько надежна молекулярно-филогенетическая реконструкция, определенное значение имеет ее соответствие гипотезам, выдвигавшимся на основе иных типов данных. Так, филогенетическое родство Glires и Primates, которое кажется неприемлимым для многих зоологов, предполагалось палеонтологом МакКенной (McKenna, 1986); эти два отряда сближаются и в классификации плацентарных, разработанной на основе палеогеографии Агаджаняном с соавт. (2000). Нелегко принять концепцию Afrotheria, поскольку до сих пор не найдено морфологических синапоморфий для этой группы (Asher, 1999). Но, например, между Macroscelidea и Paenungulata обнаружено определенное сходство в строении половой системы самцов (Bedford, Millar, 1978; Woodall, 1995). Наиболее удивительно родство с этой группой тенреков и златокротов, ранее относимых к насекомоядным. Однако по крайней мере в отношении златокротов неоднократно высказывалось предположение о том, что они не имеют отношения к собственно насекомоядным (Butler, 1972; Novacek, 1992; MacPhee, Novacek, 1993). Таким образом, насекомоядные в прежнем широком понимании (т.е. Lipotyphla) – это образец очень древней параллельной адаптивной радиации Afrotheria и Laurasiatheria, которая и привела к конвергентному сходству составляющих эти клады таксонов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярные данные имеют преимущество над немолекулярными в картировании эволюционных изменений и восстановлении истинных генеалогий; палеонтологические незаменимы при оценке возраста таксонов и событий; морфологические – при изучении направлений адаптивной радиации. Каждый из этих трех источников филогенетических знаний в равной мере необходим.

Ответ на вопрос, какие именно филогении, полученные разными методами и с помощью разных молекулярных маркеров, следует считать истинными, довольно сложен. Наиболее достоверными, по-видимому, следует считать филогенетические гипотезы, совпадающие при использовании разных молекулярных маркеров. Кроме того, не вызывает сомнения преимущество внушительных размеров комбинированной последовательности. Потенциальные возможности больших наборов данных в решении противоречивых вопросов систематики выше, чем разрешающая способность одного или нескольких генов.

Множество факторов отрицательно влияют на конгруэнтность филогенетических деревьев, статистическую поддержку и разрешение их ветвей. Для мтДНК, которая все еще остается основным орудием молекулярной филогенетики, их особенно много: это высокая скорость нуклеотидных замен, насыщение в третьей позиции кодона, непостоянство нуклеотидного состава. Ядерные экзоны эволюционируют не так быстро, как митохондриальные гены, третьи позиции кодонов у них не всегда и не в такой сильной мере насыщены, соотношение транзиций и трансверсий не такое высокое (Springer et al., 2001). Однако всегда существующая возможность их паралогии ставит не менее серьезные препятствия. В случае SINEs не могут возникать проблемы со сдвигом нуклеотидного состава, т.к. ретропозоны – это многокопийные повторы, а не отдельные нуклеотиды. Но пока далеко не для всех групп млекопитающих найдены маркирующие их генетические элементы.

Эмпирическое преодоление этих препятствий состоит в комбинировании митохондриальных и ядерных данных и сопоставлении нескольких систем, по которым проводится исследование. Причем залогом истинности филогенетического результата служит комбинирование данных, разных настолько, что это позволит избежать систематической ошибки.

Вопрос сегодня заключается в том, каким образом наиболее правильно и продуктивно оперировать одновременно всей суммой этих знаний. При этом безусловно перспективным является углубленный анализ морфологических признаков в поисках особенностей, объединяющих выделяемые молекулярной филогенетикой новые группировки млекопитающих.

Один из возможных подходов заключается в методе супердеревьев, который базируется на матричном представлении всех опубликованных филогений независимо от признаков и методологий, использованных при их построении. По млекопитающим к настоящему моменту такие супердеревья, помимо дерева взаимоотношений всех современных отрядов плацентарных (Liu et al., 2001), предложены для приматов (Purvis

1995, цит. по Grenyer, Purvis, 2003), хищных (Bininda-Emonds et al., 1999), рукокрылых (Jones et al., 2002) и насекомоядных (Grenyer, Purvis, 2003). В этом подходе, однако, слабо учитывается разная степень надежности суммированных деревьев.

Основное преимущество молекулярных методов изучения изменчивости в том, что они генерируют огромные наборы дискретных признаков, причем не только тех, которые находятся под давлением отбора, но и селективно нейтральных. Несомненно и то, что молекулярные подходы позволяют сопоставлять очень далеко отстоящие организмы. Там, где морфология бессильна найти синапоморфии, обнаруживаются гомологичные макромолекулы. Немаловажно и то, что круг объектов, из которых может быть выделена ДНК, пригодная для анализа, продолжает расширяться. Они включают теперь уже и палеонтологический материал (извлеченные из мерзлоты шкуры мамонта, кости неандертальца и т.п.) и, следовательно, существует возможность прямого сравнения последовательностей ДНК современных и по крайней мере недавно вымерших животных. Понятно, что сама техника анализа генома, так же как и методы филогенетической обработки данных будут развиваться и совершенствоваться по пути все большей автоматизации экспериментальной части и усложнения математического аппарата филогенетических алгоритмов. Но основным фактором дальнейших успехов (или разочарований) станет все же не техническая и не методологическая сторона молекулярно-филогенетических изысканий, а накопление знаний о закономерностях эволюции генома.

Теперь ясно, что разные участки генома вносят неравноценную информацию в филогенетические гипотезы и могут подавать разный филогенетический сигнал или гасить его в шуме гомоплазий. Успех современных молекулярно-филогенетических исследований во многом определяется правильным выбором гена или сочетанием генов в комбинированной последовательности. Поэтому планирование будущих исследований в области молекулярной филогенетики напрямую связано с накоплением информации о характере эволюции используемых в филогенетике участков генома. Последнее относится уже к области геномики, задача которой – обоснование выбора генов, с наибольшей достоверностью отражающих эволюцию организмов (Антонов, 2002).

Последующие десятилетия в области филогенетики млекопитающих исполнены перспектив, но одновременно и еще больших трудностей, чем ранее. Несомненно, будет получено, наконец, древо, основанное только на ядерных последовательностях и протестированное через SINEs. Но техническая и методологическая проблема сопоставления результатов и адекватного анализа огромных наборов данных по последовательностям

встанет с еще большей остротой и, возможно, опять сведется к анализу отдельных его частей хотя и с использованием более мощных компьютерных программ.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признательна А.В. Троицкому за идею написания этого обзора и постоянное внимание к ходу ее реализации, В.В. Гречко и Д.А. Крамерову — за ценные замечания, сделанные при обсуждении рукописи, В.С. Лебедеву и И.Я. Павлинову за критику.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 01-04-07031).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агаджанян А.К., Каландадзе Н.Н., Раутиан А.С., 2000. Радиация отрядов млекопитающих: новый взгляд // Палеонтол. журн. № 6. С. 69-73.
- Антонов А.С., 2002. Геномика и геносистематика // Генетика. Т. 38. № 6. С. 751-757.
- Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А., 2002. Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // Генетика. Т. 38. № 6. С. 853-864.
- Банникова А.А., Долгов В.А., Федорова Л.В., Федоров А.Н., Троицкий А.В., Ломов А.А., Медников Б.М., 1995. Родственные отношения ежей подсемейства Erinaceinae (Mammalia, Insectivora) по данным рестриктазного анализа суммарной ДНК // Зоол. журн. Т. 74. Вып. 5. С. 95-107.
- Банникова А.А., Долгов В.А., Федорова Л.В., Федоров А.Н., Ломов А.А., Медников Б.М., 1996. Дивергенция землероек (Insectivora, Soricidae) по данным рестриктазного анализа повторяющихся последовательностей ДНК // Зоол. журн. Т. 75. Вып. 2. С. 256-270.
- Беридзе Т.Г., 1982. Сателлитная ДНК. М.: Наука. 120 с.
- Брандлер О.В., 2003. Филогенетические связи и систематика сурков Евразии (*Marmota*, Rodentia, Sciuridae): цитогенетический и молекулярно-генетический анализ: Дис...канд. биол. наук. М.: ИБР РАН. С. 1-25.
- Гилева Е.А., Рыбников Д.Е., Мирошниченко Г.П., 1990. ДНК-ДНК гибридизация и филогенетические связи в двух родах полевок, *Alticola* и *Clethrionomys* (Microtinae: Rodentia) // Докл. Акад. Наук СССР. Т. 311. С. 477-480.
- Глазко В.И., Дымань Т.Н., Кутузов Д.А., Городня А.В., 2002. Участие маркеров ISSR-PCR в межвидовой дифференциации некоторых представителей видов Ungulata // Док. Рос. акад. сельскохозяйств. наук. № 5. С.36-40.
- Гречко В.В., 2002. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. Т. 38. № 8. С. 1013-1033.
- Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В., Тагиев А.Ф., Лукьяненко А.В., Формозов Н.А., 2002. Исследование гибридизации четырех видов сусликов Поволжья (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) разными молекулярно-генетическими методами // Генетика. Т. 38. № 7. С. 950-964.
- Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В., Формозов Н.А., 2003. Изучение гибридизации сусликов с использованием полиморфных маркеров ядерной ДНК // Териофауна России и сопредельных территорий (VII съезд ВТО, 6-7 фев. 2003, Москва). М: ИПЭЭ РАН. С.145-146.
- Кимура М., 1985. Молекулярная эволюция: теория нейтральности: пер. с англ. М.: Мир. 398 с.

- Крамеров Д.А.*, 1987. Основные повторяющиеся элементы генома мыши: Дис....докт. биол. наук. М.: ИМБ РАН. С. 1-50.
- Крамеров Д.А., Краев А.С., Рысков А.П., Скрыбин К.Г.*, 1980. Первичная структура высокоповторяющейся последовательности ДНК мыши, гомологичной двуспиральным участкам про-мРНК // Докл. АН СССР. Т. 252. С. 241-244.
- Матвеев В.А., Банникова А.А., Ломов А.А.*, 2000. Возможности использования метода таксонпринта ДНК в систематике рукокрылых (Chiroptera) // Plecotus et al. № 3. С. 3-19.
- Медников Б.М.*, 1980. Применение методов геносистематики в построении системы хордовых // Молекулярные основы геносистематики / Ред. Антонов А.С. М.: Изд-во МГУ. С. 203-215.
- Медников Б.М., Банникова А.А., Ломов А.А., Мельникова М.Н., Шубина Е.А.*, 1995. Рестриктазный анализ повторяющейся ядерной ДНК, критерий вида и механизм видообразования // Мол. биол. Т. 29. № 6. С. 1308-1319.
- Оловников А.М.*, 1996. Молекулярный механизм морфогенеза: теория локационной ДНК // Биохимия. Т. 61. В. 11. С. 1948-1970.
- Потапов С.Г., Рысков А.П.*, 1993. Анализ вариабельности повторяющихся элементов генома грызунов на таксономическом уровне // Генетика. Т. 29. № 5. С. 859-862.
- Потапов С.Г., Орлов В.Н., Ковальская Ю.М., Малыгин В.М., Рысков А.П.*, 1999. Генетическая дифференциация полевков трибы Arvicolini (Cricetidae, Rodentia) по данным таксонпринта ДНК и RAPD-PCR // Генетика. Т. 35. № 6. С. 403-410.
- Рысков А.П., Кудрявцев И.В., Васильев В.А., Потапов С.Г., Кудрявцев П.И., Сипко Т.П.*, 1994. Диагностические возможности молекулярно-генетических подходов к таксономии трибы Bovini // Зоол. журн. Т. 73. № 11. С. 115-123.
- Рудых И.А., Гречко В.В., Чобану Д.Г., Крамеров Д.А., Даревский И.С.*, 2002. Вариабельность сайтов рестрикции сателлитной ДНК как молекулярная основа метода таксонпринта (на примере скальных ящериц Кавказа) // Генетика. Т. 38. № 8. С. 1110-1114.
- Федоров А.Н., Гречко В.В., Слободянюк С.Я., Федорова Л.В., Тимохина Г.И.*, 1992. Таксономический анализ повторяющихся элементов ДНК // Мол.биол. Т. 26. Вып. 2. С. 464-469.
- Челомина Г.Н.*, 2000. Эколого-генетические и эволюционные аспекты биоразнообразия животных: автореф. дис. ... докт. биол. наук. Владивосток: Биолого-почвенный ин-т ДВО РАН. 49 с.
- Челомина Г.Н., Коробицына К.В., Картавцева И.В.*, 1990. Повторяющаяся ДНК, хромосомный полиморфизм и видообразование песчанок // Генетика. Т. 26. № 8. С. 1469-1477.

- Челомина Г.Н., Павленко М.В., Картавцева И.В., Боескоров Г.Г., Ляпунова Е.А., Воронцов Н.Н., 1998. Генетическая дифференциация лесных мышей Кавказа: сравнение изозимной, хромосомной и молекулярной дивергенции // Генетика. Т. 34. № 2. С. 213-225.
- Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Васитов В.А., 1999. Секвенирование ДНК. М.: Наука. 429 с.
- Adkins R.M., Honeycutt R.L., Disotell T.R., 1996. Evolution of eutherian cytochrome *c* oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome *c* // Mol. Biol. Evol. V. 13. N 10. P. 1393-1404.
- Adkins R.M., Gelke E.L., Rowe D., Honeycutt R.L., 2001. Molecular phylogeny and divergence time estimates for major rodent groups: evidence from multiple genes // Mol. Biol. Evol. V. 18. № 5. P. 777-791.
- Alexander L.G., Stone R.T., Beattie C.W., 1995. Porcine SINE-associated microsatellite markers: evidence for new artiodactyl SINEs // Mamm. Genome. V. 6. N 7. P. 464-468.
- Amrine H.M., Springer M.S., 1999. Maximum-likelihood analysis of the Tethythere hypothesis based on a multigene data set and a comparison of different models of sequence evolution // J. Mammalian Evol. V. 6. № 2. P. 161-176.
- Andrews T.D., Easteal S., 2000. Evolutionary rate acceleration of cytochrome *cox* subunit I in simian primates. // J. Mol. Evol. V. 50. N 6. P. 562-568.
- Andrews T.D., Jermiin L.S., Easteal S., 1998. Accelerated evolution of cytochrome *b* in simian primates: adaptive evolution in concert with other mitochondrial proteins? // J. Mol. Evol. V. 47. N 3. P. 249-257.
- Arctander P., 1995. Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene // Proc. R. Soc. Lond. B. V. 262. Pp. 13-19.
- Arnason U., Widegren B., 1986. Pinniped phylogeny enlightened by molecular hybridization using highly repetitive DNA. Mol. Biol. Evol. V. 3. N 5. P. 356-365.
- Arnason U., Høglund M., Widegren B., 1984. Conservation of highly repetitive DNA in cetaceans // Chromosoma. V. 89. N 3. P. 238-242.
- Arnason U., Gullberg A., Janke A., 1999. The mitochondrial DNA molecule of the aardvark, *Oryzomys afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree // Proc. R. Soc. Lond. V. 266. P. 339-345.
- Arnason U., Allderdice P.W., Lien J., Widegren B., 1988. Highly repetitive DNA in the baleenwhale genera *Balaenoptera* and *Megaptera* // J. Mol. Evol. V. 27. N 3. P. 217-221.
- Arnason U., Adegoke J.A., Bodin K., Born E.W., Esa Y.B., Gullberg A., Nilsson M., Short R.V., Xu X., Janke A., 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree // Proc. Nat. Amer. Sci. V. 99. № 12. P. 8151-8156.
- Asher R.J., 1999. A morphological basis for assess the phylogeny of the “Tenrecoidea” (Mammalia,

- Lipotyphla) // *Cladistics*. V. 15. N 3. P. 231-252.
- Avise J.C.*, 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection // *Molecular Ecology*. V.7. N 1. P. 371-379.
- Bachmann L., Schibel J.M., Raab M., Sperlich D.*, 1993. Satellite DNA as taxonomic marker // *Biochem. Syst. Ecol.* V. N 1. 21. P. 3-11.
- Backeljau T., De Bruyn L., De Wolf H., Jordaens K., Van Dongen S., Verhagen R., Winnepenninckx B.*, 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods // *Cladistics*. V. 11. N 2. P. 119-130.
- Balloux F., Brunner H., Lugon-Moulin N., Hausser J., Goudet J.*, 2000a. Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study // *Evolution*. V. 54. № 4. P. 1414-1422.
- Balloux F., Lugon-Moulin N., Hausser J.*, 2000b. Estimating gene flow across hybrid zones: how reliable are microsatellites? // *Acta Theriologica*. V. 45. № 1. P. 93-101.
- Bannikova A.A., Lavrenchenko L.A., Lomov A.A., Mednikov B.M.*, 2002. Molecular diversity of some *Crocidura* species (Insectivora, Soricidae) from Ethiopia / Eds Denis C., Granjon L., Poulet A. African small mammals. Orstom, coll. A travers champs. Paris: Inst. De Recherche pour le Developpement. P. 55-64.
- Barrie P.A., Jeffreys A.J., Scott A.F.*, 1981. Evolution of the  $\beta$ -globin gene cluster in man and primates // *J. Mol. Biol.* V. 149. P. 319-336.
- Bedford J.M., Millar R.P.*, 1978. The character of sperm maturation in the epididimis of the ascrotal hyrax, *Procavia capensis* and armadillo, *Dasybus novemcinctus* // *Biol. Reproduction*. V. 19. P. 396-406.
- Bininda-Emonds O.R.P., Gittleman J.L., Purvis A.*, 1999. Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia) // *Biol. Rev.* V. 74. P. 143-175.
- Bogenberger J.M., Neitzel H., Fittler F.*, 1987. A highly repetitive DNA component common to all Cervidae: its organization and chromosomal distribution during evolution // *Chromosoma*. V. 95. N 2. P. 154-161.
- Borodulina O.R., Kramerov D.A.*, 1999. Wide distribution of short interspersed elements among eukaryotic genomes // *Federation of European Biochemical Societies Letters*. V. 457. N 3. P. 409-413.
- Borodulina O.R., Kramerov D.A.*, 2001. Short interspersed elements (SINEs) from Insectivores. Two classes of mammalian SINEs distinguished by A-rich tail structure // *Mammalian Genome*. V.12. N 10. P. 779-786.
- Boursot P., Din W., Anand R.*, 1996. Origin and radiation of the house mouse: mitochondrial DNA phylogeny // *J. Evol. Biol.* V. 9. P. 391-415.

- Bowditch B.M., Albright D.G., Williams G.K., Braun M.J.*, 1993. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies // *Methods Enzymol.* V. 224. P. 294-309.
- Brown W.M., Gerge M.L., Wilson A.C.*, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* V. 76. P. 1967-1971.
- Brown W.M., Prager E.H., Wang A., Wilson A.C.*, 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates; tempo and mode of evolution // *J. Mol. Evol.* V. 18. N 1. P. 225-239.
- Buntjer J.B.*, 1997. DNA repeats in the vertebrate genome as probes in phylogeny and species identification. Utrecht: Utrecht. Universiteit. 130 p.
- Buntjer J.B., Lenstra J.A., Haagsma N.*, 1995. Rapid species identification by using satellite DNA probes // *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* V. 201. P. 577-582.
- Burton F.H., Loeb D.D., Voliva C.V., Martin S.I., Edgell M.H., Hutchison C.A.*, 1986. Conservation throughout mammalia and extensive protein-encoding capacity of the highly repeated DNA long interspersed sequence one // *J. Mol. Biol.* V. 187. P. N 2. 291-304.
- Butler P.M.*, 1972. The problem of insectivore classification // *Studies in Vertebrate Evolution* / Eds Joysey K.A., Kemp T.S. N.-Y.: Winchester Press. P. 253-265.
- Cao Y., Okada N., Hasegawa M.*, 1997. Phylogenetic position of guinea pigs revisited // *Mol. Biol. Evol.* V. 14. N 4. P. 461-464.
- Catzefflis F.M., Aguilar J.-P., Jaeger J.-J.*, 1992. Muroid rodents: phylogeny and evolution // *Trends Rev. Ecol. Evol.* V. N 7. P. 122-126.
- Catzefflis F.M., Hanni C., Sourrouille P., Douzery E.*, 1995. Molecular systematics of hystricognath rodents: The contribution of sciurognath mitochondrial 12S rRNA sequences // *Mol. Phyl. Evol.* V. 4. № 3. P. 357-360.
- Chikuni K., Miri Y., Tabata M., Monma M., Kosugiyama M.*, 1995. Molecular phylogeny based on the k-casein and cytochrome b sequences in the mammalian suborder Ruminantia // *J. Mol. Evol.* V. 41. N 6. P. 859-866.
- Conroy C.J., Cook J.A.*, 1999. MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within Arvicolinae and Murid rodents // *J. Mammal. Evol.* V. 6. № 3. P. 221-244.
- Dallas J.F., Dod B., Boursot P.*, 1995. Population subdivision and gene flow in Danish house mice // *Mol. Ecol.* V. 4. N 3. P. 3110320.
- D'Erchia A.M., Gissi C., Pesol G., Saccone C., Arnason U.*, 1996. The guinea-pig is not a rodent // *Nature.* V. 381. P. 597-600.
- DeBry R.W., Sagel R.M.*, 2001. Phylogeny of rodentia (Mammalia) inferred from the nuclear-encoded gene IRBR // *Mol. Phyl. Evol.* V. 19. № 2. P. 290-301.

- De Jong W.W.*, 1998. Molecules remodel the mammalian tree // *Trends Ecol. Evol.* V. 13. № 7. P. 270-275.
- De Jong W.W., Zweers A., Goodman M.*, 1981. Relationship of aardvark to elephants, hyraxes, and sea cows from alpha-crystallin sequences // *Nature*. V. 292. P. 539-540.
- Dimitri P., Junakovic N.*, 1999. Revising the selfish DNA hypothesis. New evidence on accumulation of transposable elements in heterochromatin // *Trends in Genetics*. V. 15. № 4. P. 123-124.
- Dod B., Mottez E., Desmarais E., Bonhomme F., Roizez G.*, 1989. Concerted evolution of light satellite DNA in genus *Mus* implies amplification and homogenization of large blocks of repeats // *Mol. Biol. Evol.* V. 6. N 5. P. 478-491.
- Douady C.J., Chatelier P.I., Madsen O., De Jong W.W., Catzeflis F., Springer M.S., Stanhope M.J.*, 2002. Molecular phylogenetic evidence confirming the Eulipotyphla concept and in support of hedgehogs as the sister group to shrews // *Mol. Phyl. Evol.* V. 25. № 1. P. 200-209.
- Dover G.A.*, 1982. Molecular drive a cohesive mode of species evolution // *Nature*. V. 299. P. 11-117.
- Dover G.A.*, 1986. Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated // *Trends Genet.* V. 2. N 1. P. 159-165.
- Dubois J.-Y., Rakotondravony D., Hanni C., Sourrouille P., Catzeflis F.M.*, 1996. Molecular Evolutionary relationships of three genera of Nesomyinae, endemic rodent taxa from Madagascar // *J. Mammal. Evol.* V. 3. № 3. P. 239-260.
- Fedorov A.N., Fedorova L.V., Grechko V.V., Ryabinin D.M., Sheremet`eva V.A., Bannikova A.A., Lomov A.A., Ryskov A.P., Darevsky I.S.*, 1999. Variable and invariable DNA repeat characters revealed by taxonprint approach are useful for molecular systematics // *J. Mol. Evol.* V.48. N 1. P.69-76.
- Foster P.G., Hickey D.A.*, 1999. Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions // *J. Mol. Evol.* V. 48. N 3. P. 284-290.
- Frye M.S., Hedges S.B.*, 1995. Monophyly of the order Rodentia inferred from mitochondrial DNA sequences of the genes for 12S rRNA, 16S rRNA, and tRNA-valine // *Mol. Biol. Evol.* V. 12. N 1. P. 168-176.
- Fumagalli L., Taberlet P., Stewart D., Gielly L., Hausser J., Vogel P.*, 1999. Molecular phylogeny and evolution of *Sorex* shrews (Soricidae: Insectivora) inferred from mitochondrial DNA sequence data // *Mol. Phyl. Evol.* V. 11. № 2. P. 222-235.
- Gatesy J.*, 2001. Relative quality of different systematic datasets for cetartiodactyl mammals: assessments within a combined analysis framework // *Molecular systematics and evolution: theory and practice* / Eds DeSalle R., Giribet G., Wheeler W. Boston-Berlin-Basel: Birkhauser-Verlag. P. 45-67.

- Gilbert N., Labuda D.*, 2000. Evolutionary Inventions and Continuity of CORE-SINEs in Mammals // *J. Mol. Biol.* V. 298. N 3. P. 365-377.
- Graur D., Hide W.A., Li W.-H.*, 1991. Is the guinea pig a rodent? // *Nature*. V. 351. P. 649-652.
- Graur D., Higgins D.G.*, 1994. Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla // *Mol. Biol. Evol.* V. 11. N 3. P. 357-364.
- Grenyer R., Purvis A.*, 2003. A composite species-level phylogeny of the “Insectivora” (Mammalia: order Lipotyphla Haeckel, 1866) // *J. Zool. Lond.* V. 260. P. 245-257.
- Grechko V.V., Fedorova L.V., Slobodyanyuk S.Ya., Ryabinin D.M., Melnikova M.N., Bannikova A.A., Lomov A.A., Sheremet`eva V.A., Gorshkov V.A., Sevostyanova G.A., Semenova S.K., Ryskov A.P., Mednikov B.M., Darevsky I.S.*, 1997. Restriction endonuclease analysis of highly repetitive DNA as a phylogenetic tool // *J. Mol. Evol.* V.45. N 3. P. 332-336.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B.*, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // *Mol. Ecol.* V. 1. N 1. P. 55-63.
- Hardison R., Miller W.*, 1993. Use of long sequence alignments to study the evolution and regulation of mammalian globin gene clusters // *Mol. Biol. Evol.* V. 10. N 1. P. 73-102.
- Harrison R.G.*, 1989. An animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology // *Trends Ecol. Evol.* V. 4. № 1. P. 6-11.
- Hassanin A., Lecointre G., Tillier S.*, 1998. Related articles, links abstract. The «evolutionary signal» of homoplasmy in protein-coding gene sequences and its consequences for a priori weighting in phylogeny // *C.R. Acad. Sci.* V. 321. № 7. P. 611-620.
- Hasegawa M., Hashimoto T.*, 1993. Ribosomal RNA trees misleading? // *Nature*. V. 361. P. 23.
- Hedrick P.W.*, 1999. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation // *Evolution*. V. 53. N 2. P. 313-318.
- Hewitt G.M.*, 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time // *Mol. Ecol.* V. 10. N 3. P. 537-549.
- Hillis D.M.*, 1996. Inferring complex phylogenies // *Nature*. V. 383. P. 130-131.
- Holmquist G.P., Filinski J.*, 1994. Organisation of mutants along the genome: a prime determinant of genome evolution // *Trends Ecol. Evol.* V. 9. N 2. P. 65-69.
- Huchon D., Madsen O., Sibbald M., Ament Kai, Stanhope M.J., Catzeflis F., De Jong W.W., Douzery E.J.P.*, 2002. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes // *Mol. Biol. Evol.* V. 19. № 7. P. 1053-1065.
- Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C.*, 1991. Evolution of the cytochrom *b* Gene of Mammals // *J. Mol. Evol.* V. 32. N 2. P. 128-144.
- Irwin D.M., Arnason U.*, 1994. Cytochrom *b* gene of marine mammals: phylogeny and evolution // *J. Mammal. Evol.* V. 2. N 1. P. 37-55.

- Janecek L.L., Honeycutt R.L., Adkins R.M., Davis S.K.*, 1996. Mitochondrial gene sequences and the molecular systematics of the artiodactyl subfamily bovinæ // *Mol. Phyl. Evol.* V. 6. N 1. P. 107-119.
- Janke A., Xu X., Arnason U.*, 1997. The complete mitochondrial genome of the wallaroo (*Macropus robustus*) and the phylogenetic relationship among Monotremata, Marsupialia, and Eutheria // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 1276-1281.
- Jeffreys A.J., Wilson F., Thein S.L.*, 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA // *Nature.* V. 314. P. 67-73.
- Jenkins P., Ruedi M., Catzeflis F.M.*, 1998. A biochemical and morphological investigation of *Suncus dayi* (Dobson, 1888) and discussion of relationships in *Suncus* Hemprich and Ehrenberg, 1833, *Crocidura* Wagler, 1832, and *Sylvisorex* Thomas, 1904 (Insectivora: Soricidae) // *Bonn. Zool. Beitr.* B. 47. H. 3-4. S. 257-276.
- Jobse C., Buntjer J.B., Haagsma N., Breukelman H.J., Beintema J.J., Lenstra J.A.*, 1995. Evolution and recombination of bovine DNA repeats // *J. Mol. Evol.* V. 41. N 3. P. 277-283.
- Jones K.E., Purvis A., MacLarnon A., Bininda-Emonds O.R.P., Simmons N.B.*, 2002. A phylogenetic supertree of the bats (Mammalia: Chiroptera) // *Biol. Rev.* V. 77. P. 223-259.
- Jurka J., Zietkiewicz E., Labuda D.*, 1995. Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era // *Nucl. Acids Res.* V. 23. № 1. P. 170-175.
- Karlin S., Mrazek J.*, 1997. Compositional differences within and between eukaryotic genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 94. P. 10227-10232.
- Kaukinen J., Varvio S-L.*, 1992. Artiodactyl retroposons: Association with microsatellites and use in SINEmorph detection by PCR // *Nucl. Acids Res.* V. 20. P. 2955-2958.
- Kawai K., Nikaido M., Harada M., Matsumura S., Lin L.-K., Wu Yi, Hasegawa M., Okada N.*, 2002. Intra- and interfamily relationships of Vespertilionidae inferred by various molecular markers including SINE insertion data // *Mol. Evol.* V. 55. P. 284-301.
- Killian J.K., Buckley T.R., Stewart N., Munday B.L., Jirtle R.L.*, 2001. Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution // *Mammalian Genome.* V. 12. N 7. P. 513-517.
- Kirsch J.W., Hutcheon J.M., Byrnes D.G.P., Lloyd B.D.*, 1998. Affinities and historical zoogeography of the New Zealand short-tailed bat, *Mystacina tuberculata* Gray 1843, inferred from DNA-hybridization comparisons // *J. Mammal. Evol.* V. 5. № 1. P. 33-64.
- Kordis D., Gubensek F.*, 1998. Unusual horizontal transfer of a long interspersed nuclear element between distant vertebrate classes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 95. P. 10704-10709.
- Kramerov D., Vassezky N., Serdobova I.*, 1999. The evolutionary position of dormice (Gliridae) in Rodentia determined by a novel short retroposon // *Mol. Biol. Evol.* V. 16. № 5. P. 715-717.

- Krayev A.S., Kramerov D.A., Skryabin K.G., Ryskov A.P., Bayev A.A., Georgiev G.P.*, 1980. The nucleotide sequence of the ubiquitous repetitive DNA sequence B1 complementary to the most abundant class of mouse fold-back RNA // *Nucl. Acids Res.* V. 8. N 6. P. 1201-1215.
- Krayev A.S., Markusheva T.V., Kramerov D.A., Ryskov A.P., Skryabin K.G., Bayev A.A., Georgiev G.P.* 1982. Ubiquitous transposon-like repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing // *Nucl. Acids Res.* V. 10. N 23. P. 7461-7475.
- Krettek A., Gullberg A., Arnason U.*, 1995. Sequence analysis of the complete mitochondrial DNA molecule of the hedgehog, *Erinaceus europaeus*, and the phylogenetic position of the Lipotyphla // *J. Mol. Evol.* V. 41. N 6. P. 952-957.
- Kumar S., Hedges B.*, 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution // *Nature.* V. 392. P. 917-920).
- Lavrenchenko L.A., Potapov S.G., Lebedev V.S., Ryskov A.P.*, 2001. The phylogeny and systematics of the endemic Ethiopian *Lophuromys flavopunctatus* species complex based upon random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis // *Biochem. Syst. Ecol.* V. 29. N 11. P. 1139-1151.
- Lecointre G., Philippe H., Van Le H.L., Le Guyader H.*, 1993. Species sampling has a major impact on phylogenetic inference // *Mol. Phyl. Evol.* V. 2. N 3. P. 205-224.
- Ledje C., Arnason U.*, 1996. Phylogenetic relationships within Caniform Carnivores based on analyses of the mitochondrial 12S rRNA gene // *J. Mol. Evol.* V. 43. N 6. P. 641-649.
- Li W.-H., Hide W.A., Zharkikh A., Ma D.-P., Graur D.*, 1992. The molecular taxonomy and evolution of the guinea pig // *J. Heredity.* V. 83. P. 174-181.
- Lima-de-Faria A., Arnason U., Widegren B., Essen-Moller J, Isaksson M, Olsson E, Jaworska H.* 1984. Conservation of repetitive DNA sequences in deer species studied by Southern blot transfer // *J. Mol. Evol.* V. 20. N 1. P. 17-24.
- Lin Yu-H., Penny D.*, 2001. Implications for bat evolution from two new complete mitochondrial genomes // *Mol. Biol. Evol.* V. 18. N 4. P. 684-688.
- Lin Yu-H., Waddell P., Penny D.*, 2002. Pika and vole mitochondrial genomes increase support for both rodent monophyly and glires // *Gene.* V. 294. P. 119-129.
- Liu Fu-Guo R., Miyamoto M.M., Freire N.P., Ong P.Q., Tennant M.R., Young T.S., Gugel K.F.*, 2001. Molecular and morphological supertrees for Eutherian (Placental) mammals // *Science.* V. 291. P. 1786-1789.
- Luckett W.P., Hartenberger J.-L.*, 1993. Monophyly or polyphyly of the order Rodentia: possible conflict between morphological and molecular interpretations // *J. Mammal. Evol.* V. 1. N 2. P. 127-147.

- MacPhee R.D.E., Novacek M.J.*, 1993. Definition and relationships of Lipotyphla // Mammal phylogeny: placentals / Eds Szalay F.S., Novacek M.J., McKenna M.C. Springer-Verlag. N.- Y. P. 13-31.
- Maddalena T.*, 1990. Systematics and biogeography of Afrotropical and Palaeartic shrews of the genus *Crocidura* (Insectivora: Soricidae): an electrophoretic approach // Vertebrates in the Tropics / Eds Peters G., Hutterer R. Bonn: Mus. Alexander Koenig. P. 297-308.
- Madsen O., Scally M., Douady C.J., Kao D.J., DeBry R.W., Adkins R., Amrina H.M., Stanhope M.J., De Jong W.W., Springer M.S.*, 2001. Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals // Nature. V. 409. P. 610-614.
- Marshall L.G.*, 1979. Evolution of metatherian and eutherian (mammalian) characters: a review based on cladistic methodology // Zool. J. Linn. Soc. V. 66. P. 369-410.
- Martin Y., Gerlach G., Schlotterer C., Meyer A.*, 2000. Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete cytochrome b sequences // Mol. Phyl. Evol. V. 16. № 1. P. 37-47.
- McKenna M.C.*, 1975. Phylogeny of the Primates: a Multidisciplinary // Approach Toward a phylogeny and classification of the Mammalia / Eds Luckett W.P., Szalay F.S. N.-Y.: Plenum Press. P. 21-46.
- McKenna M.C.*, 1986. Glirology // Science. V. 231. P. 1666-1667.
- Miklos G.L.G.*, 1985. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes // Molecular evolutionary genetics / Ed. MacIntyre R.J. N.-Y.: Plenum Press. P. 140.
- Miyamoto M.M., Goodman M.*, 1986. Biomolecular systematics of eutherian mammals: phylogenetic patterns and classification // Syst. Zool. V. 35. P. 230-240.
- Miyamoto M.M.*, 1999. Molecular systematics: perfect SINEs of evolutionary history? // Current Biol. V. 9. № 21. P. 816-819.
- Modi W.S.*, 1996. Phylogenetic history of LINE-1 among arvicolid rodents // Mol. Biol. Evol. V. 13. N 5. Pp. 633-641.
- Modi W.S., Gallagher D., Womack J.E.*, 1996. Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the Artiodactyla (Mammalia) // J. Mol. Evol. V. 42. N 3. P. 337-349.
- Montgelard C., Catzeflis F.M., Douzery E.*, 1997. Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparison of cytochrom b and 12S rRNA mitochondrial sequences // Mol. Biol. Evol. V. 14. N 5. P. 550-559.
- Montgelard C., Bentz S., Tirard C., Verneau O., Catzeflis F.M.*, 2002. Molecular systematics of Sciurognathi (Rodentia): the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes support the Anomaluroidea (Pedetidae and Anomaluridae) // Mol. Phyl. Evol. V. 22. N 2. P. 220-233.

- Motokawa M., Suzuki H., Harada M., Lin L.-K., Koyasu K., Oda S.*, 2000. Phylogenetic relationships among East Asian Species of *Crocidura* (Mammalia, Insectivora) inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences // *Zool. Sci.* V. 17. P. 497-504.
- Mouchaty S. K. Gullberg A., Janke A., Arnason U.*, 2000a. The phylogenetic position of the Talpidae within Euteria based on analysis of complete mitochondrial sequences // *Mol. Biol. Evol.* V. 17. N 1. P. 60-67.
- Mouchaty S. K. Gullberg A., Janke A., Arnason U.*, 2000b. The phylogenetic position of the tenrecs (Mammalia: Tenrecidae) of Madagascar based on analysis of complete mitochondrial genome sequence of *Echinops telfairi* // *Zool. Scr.* V. 29. P. 307-317.
- Murphy W.J., Eizirik E., Johnson W.E., Zhang Ya P., Ryder O.A., O'Brien S.J.*, 2001a. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals // *Nature*. V. 409. P. 614-617.
- Murphy W.J., Eizirik E., O'Brien S.J., Madsen O., Scally M., Douady C.J., Teeling E., Ryder O.A., Stanhope M.J., De Jong W.W., Springer M.S.*, 2001b. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics // *Science*. V. 294. P. 2348-2351.
- Narita Y., Oda S., Takenaka O., Kageyama T.*, 2001. Phylogenetic Position of Eulipotyphla inferred from the cDNA sequences of pepsinogens A and C // *Mol. Phyl. Evol.* V. 21. № 1. P. 32-42.
- Naylor G., Brown W.*, 1998. *Amphioxus* mtDNA, chordate phylogen, and the limits of inference based on comparisons of sequences // *Syst. Biol.* V. 47. P. 61-76.
- Nedbal M.A., Allard M.W., Honeycutt R.L.*, 1994. Molecular systematics of hystricognath rodents: Evidence from the mitochondrial 12S rRNA gene // *Mol. Phyl. Evol.* V. 3. N 3. P. 206-220.
- Nedbal M.A., Honeycutt R.L., Schlitter D.A.*, 1996. Higher-level systematics of rodents (Mammalia, Rodentia): evidence from mitochondrial 12S rRNA gene // *J. Mammal. Evol.* V. 3. N 3. P.201-237.
- Nelson D.L.*, 1991. Interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction (IRS-PCR) for generation of human DNA fragments from complex sources // *Methods, Companion Methods Enzymol.* V. 2. P. 60-74.
- Neigel J.E., Avise J.C.*, 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation // *Evolutionary processes and theory / Eds Nevo E., Karlin S.* N.-Y.: Acad. Press. P. 515-534.
- Neigel J.E., Ball R., Martin R., Avise J.C.*, 1991. Estimation of single generation migration distances from geographic variation in animal mitochondrial DNA // *Evolution*. V. 45. № 2. P. 423-432
- Nikaido M., Rooney A.J., Okada N.*, 1999. Phylogenetic relationships among Cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. V. 96. N 18. P. 10261-10266.

- Nikaido M., Harada M., Cao Y., Hasegawa M., Okada N., 2000. Monophyletic origin of the order Chiroptera and its phylogenetic position among Mammalia inferred from the complete mitochondrial DNA sequence of a Japanese megabat, Ryukyu flying fox (*Pteropus dasymallus*) // J. Mol. Evol. V. P.51. N 4. P. 318-328.*
- Nikaido M., Kawai K., Cao Y., Harada M., Tomita S., Okada N., Hasegawa M., 2001. Maximum Likelihood Analysis of the Complete Mitochondrial Genomes of Eutherians and a Reevaluation of the Phylogeny of Bats and Insectivores // J.Mol. Evol. V. 53. N 4-5. P. 508-516.*
- Nikaido M., Cao Y., Okada N., Hasegawa M., 2003a. The phylogenetic relationships of insectivores with special reference to the lesser hedgehog tenrec as inferred from the complete sequence of their mitochondrial genome // Genes Genet. Syst. V. 78. N 1. P. 107-112.*
- Nikaido M., Nishihara H., Hukumoto Y., Okada N., 2003b. Ancient SINEs from African endemic mammals // Mol. Biol. Evol. V. 20. № 4. P. 522-527.*
- Novacek M.J., 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree // Nature. V. 356. P. 121-125.*
- Ohdachi S., Masuda R., Abe H., Adachi J., Dokuchaev E., Haukisalmi V., Yoshida M.C., 1997. Phylogeny of Eurasian soricine shrews (Insectivora, Mammalia) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene sequences // Zool. Sci. V. 14. P. 527-532.*
- Okada N., 1990. SINEs // Curr. Opin. Genet. Dev. V. 1. P. 498-504.*
- Op het Veld C.W., van Hees-Stuivenberg S., van Zeeland A.A., Jansen J.G., 1997. Effect of nucleotides excision repair on hprt gene mutations in rodent cells exposed to DNA ethylating agents // Mutagenesis. V. 12. P. 417-424.*
- Orgel L., Crick F., 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite // Nature. V. 284. P. 604-607.*
- Palumbi S.R., Cipriano F., Hare M.P., 2001. Predicting nuclear gene coalescence fom mitochondrial data: the three-times rule // Evolution. V. 55. № 5. P. 859-868.*
- Pech M., Streeck R.E., Zachau H.G., 1979. Patchwork structure of a bovine satellite DNA // Cell. V. 18. P.883-893.*
- Penny D., Hasegawa M., 1997. Molecular systematics. The platypus put in its place // Nature. V. 387. P. 549-550.*
- Pesole G., Sbisa E., Preparata G., Saccone C., 1992. The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man // Mol. Biol. Evol. V. 9. N 4. P. 587-598.*
- Phillips M.L., Lin Y.-H., Harrison G.L., Penny D., 2001. Complete mitochondrial sequences for two marsupials, a bandicoot and a brushtail possum // Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. V. 268. P. 1533-1538.*
- Plante Y., Boag P., White B.N., 1989. Microgeographic variation in mitochondrial DNA of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to population density // Evolution. V. 43. № 7. P. 1522-1557.*

- Querouil S., Hutterer R., Barriere P., Colyn M., Kerbis Peterhans J.C., Verheyen E.*, 2001. Phylogeny and evolution of African shrews (Mammalia: Soricidae) inferred from 16S rRNA sequences // *Mol. Phyl. Evol.* V. 20. № 2. P. 185-195.
- Reyes A., Pesole G., Saccone C.*, 2000. Long-branch attraction phenomenon and the impact of among-site rate variation on rodent phylogeny // *Gene.* V. 259. N 1-2. P. 177-187.
- Romer A.S.*, 1966. *Vertebrate Paleontology*. Chicago: Univ. Chicago Press. 458 p.
- Rosenberg M.S., Kumar S.*, 2001. Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 98. № 19. P. 10751-10756.
- Russo C.A.M., Takezaki N., Nei M.*, 1996. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny // *Mol. Biol. Evol.* V. 13. № 3. P. 525-536.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.*, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press. 398 p.
- Santucci F., Emerson B.C., Hewitt G.M.*, 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs // *Mol. Ecol.* V. 7. N 9. P. 1-10.
- Sarich V.M.*, 1993. Mammalian systematics: twenty-five years among their albumins and transferrins // *Mammal Phylogeny: Placentals* / Eds Szalay F.S., Novacek M.J., McKenna M.C. Berlin: Springer-Verlag. P. 103-114.
- Seddon J.M., Santucci F., Reeve N.J., Hewitt G.M.*, 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes // *Mol. Ecol.* V. 10. N 9. P. 2187-2198.
- Serdobova I.M., Kramerov D.A.*, 1998. Short retroposons of the B2 superfamily: evolution and application for the study of rodent phylogeny // *J. Mol. Evol.* V. 46. N 2. P. 202-214.
- Schmitz J., Ohme M., Zischler H.*, 2002. The complete mitochondrial sequence of *Tarsius bancanus*: evidence for an extensive nucleotide compositional plasticity of Primate mitochondrial DNA // *Mol. Biol. Evol.* V. 19. № 4. P. 544-553.
- Shedlock A.M., Okada N.*, 2000. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics // *BioEssays.* V. 22. № 2. P. 148-160.
- Shimamura M., Yasue H., Ohshima K.*, 1997. Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates // *Nature.* V. 388. P. 666-670.
- Shoshani J., McKenna M.C.*, 1998. Higher taxonomic relationships among extant mammals based on morphology, with selected comparisons of results from molecular data // *Mol. Phyl. Evol.* V. 9. № 3. P. 572-584.
- Showers C.P.*, 2002. Complete mitochondrial genomes and eutherian evolution // *J. Mammal. Evol.* V. 9. № 4. P. 281-305.

- Sibley C.G., Ahlquist J.E.*, 1984. The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization // *J. Mol. Evol.* V. 20. N 1-2. P. 2-15.
- Singer M.F.*, 1982. SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes // *Cell.* V. 28. P. 433-434.
- Slattery J.P., Murphy W.J., O'Brien S.J.*, 2000. Patterns of diversity among SINE elements isolated from three Y-chromosome genes in Carnivores // *Mol. Biol. Evol.* V. 17. № 5. P. 825-829.
- Smit A., Riggs A.*, 1995. MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation // *Nucl. Acids Res.* V. 23. № 1. P. 98-102.
- Smith J.J., Scott-Craig J.S., Leadbetter J.R., Bush G.L., Roberts D.L., Eubright D.W.*, 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis // *Mol. Phyl. Evol.* V. 3. N 2. P. 135-145.
- Springer M.S., Cleven G.C., Madsen O., De Jong W.W., Waddell V.G., Amrine H.M., Stanhope M.J.*, 1997. Endemic African mammals shake the phylogenetic tree // *Nature.* V. 388. P. 61-64.
- Springer M.S., Debry R.W., Douady C., Amrine H.M., Madsen O., De Jong W.W., Stanhope M.J.*, 2001. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction // *Mol. Biol. Evol.* V. 18. N 2. P. 132-142.
- Stanhope M.J., Waddell V.G., Madsen O., De Jong W., Hedges S.B., Cleven G.C., Kao D., Springer M.S.*, 1998. Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African insectivore mammals // *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 95. N 17. P.9967-9972.
- Sullivan J., Swofford D.*, 1997. Are guinea pigs rodents? The importance of adequate models in molecular phylogenetics // *J. Mammal. Evol.* V. 4. N 2. P. 77-86.
- Swofford D., Olsen G.J., Waddell P.J., Hillis D.M.*, 1996. Phylogenetic inference // *Molecular Systematics* / Eds Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Sunderland: Sinauer. P. 407-514.
- Taberlet P., Fumagalli L., Hausser J.*, 1994. Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora) // *Evolution.* V. 48. P. 623-636.
- Tachida H., Iizuka M.*, 1993. A population genetic study of the evolution of SINEs. I. Polymorphism with regard to the presence or absence of an element // *Genetics.* V. 133. N 4. P. 1023-1030.
- Teeling E.C., Scally M., Kao D.J., Romagnoli M.L.*, 2000. Molecular evidence regarding the origin of echolocation and flight in bats // *Nature.* V. 403. P.188-192.
- Teeling E.C., Madsen O., Van Den Bussche R.A., De Jong W.W., Stanhope M.J., Springer M.S.*, 2002. Microbat paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats // *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 99. № 3. P. 1431-1436.

- Ursing B., Arnason U.*, 1998. Analyses of mitochondrial genomes strongly support hippopotamus-whale clade // *Proc. R. Soc. Lond. B.* V. 265. P. 2251-2255.
- Usdin K., Chevret P., Catzeflis M., Verona R., Furano A.*, 1995. L1 (LINE-1) retrotransposable elements provide a “fossil” record of the phylogenetic history of Murid rodents // *Mol. Biol. Evol.* V. 12. № 1. P. 73-82.
- Vidal-Rioja L., Zambelli A., Semorile L.*, 1994. An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparisons // *Hereditas.* V. 121. N 3. P. 283-290.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // *Nucl. Acids Res.* V. 23. № 21. P. 4407-4414.
- Waddell P., Shelley S.*, 2003. Evaluating placental inter-ordinal phylogenies with novel sequences including RAG1, gamma-fibrinogen, ND6 and mt-tRNA plus MCMC-driven nucleotide, amino acid and codon models // *Mol. Phyl. Evol.* V. 28. N 2. P. 197-224.
- Waddell P., Okada N., Hasegawa M.*, 1999a. Towards resolving the interordinal relationships of placental mammals // *Syst. Biol.* V. 48. N 1. P. 1-5.
- Waddell P.J., Cao Y., Hauf J., Hasegawa M.*, 1999b. Using novel phylogenetic methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid-invariant sites-logDet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant // *Syst. Biol.* V. 48. N 1. P. 31-53.
- Waddell P., Kishino H., Ota R.*, 2001. A phylogenetic foundation for comparative mammalian genomics // *Genome Informatics.* V. 12. P. 141-154.
- Welsh J., McClelland M.*, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // *Nucleic Acids Research.* V. 18. N 24. P. 7213-7218.
- Welsh J., McClelland M.*, 1991. Genomic fingerprinting using of primers // *Nucleic Acids Research.* V. 19. N 19. P. 5275-5279.
- Wendel J.F., Doyle J.J.*, 1998. Phylogenetic incongruence: Window into genome history and molecular evolution // *Molecular Systematics of Plants II/ Eds Soltis D., Soltis P., Doyle J.* Boston: Kluwer Acad. Publ. P. 265-296.
- Whelan S., Lio P., Goldman N.*, 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past // *Trends Genet.* V. 17. P. 262-272.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.L., Rafalski J.A., Tingey S.V.*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids Res.* V. 18. N 22. P. 6531-6535.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M.*, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics // *Biol. J. Linnean Soc.* V. 26. P. 375-400.

- Woodall P.F., 1995. The male reproductive system and the phylogeny of elephant-shrews (Macroscelidea) // Mammal. Rev. V. 25. № 1-2. P. 87-93.
- Yang Z., 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses // Trends Ecol. Evol. V. 11. N 9. P. 367-372.
- Yasue H., Wada Y., 1996. A swine SINE (PRE-1 sequence) distribution in swine-related animal species and its phylogenetic analysis in swine genome // Anim. Genet. V. 27. N 2. P. 95-98.
- Yoder A.D., Irwin J., 1999. Phylogeny of the Lemuridae: effects of character and taxon sampling on resolution of species relationships within *Eulemur* // Cladistics. V. 15. N 3. P. 351-361.
- Zardoya R., Meyer A., 1998. Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 95. N 24. P. 14226-1431.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. V. 20. N 2. P. 176-183.

Таблица 1.

Разнообразие и границы применения маркеров ДНК в молекулярно-филогенетическом анализе.

Маркер или метод		Разрешающая возможность маркеров								
		Н/о	Отряд	Семейство	Род	Вид	Популяция	Семья	Индивид	
Секвенирование										
мтДНК	12S рРНК	...+	+	+	+	+	-	-	-	
	16S рРНК	-	+	+	+	+	-	-	-	
	<i>Cytb</i>	...+	+	+	+	+	...+	-	-	
	ND <sub>4</sub> , ND <sub>5</sub>	-	-	+	+	+	-	-	-	
	D-loop	-	-	-	-	+	+	+	...	
ядДНК	гены	vWF, M6P/IGF2R, A2AB, BRCA,	+	+	+	+	+	-	-	-
		интроны	-	...	+	+	+	...+	-	-
	Повторы	SINEs	-	...+	+	+	+	-	-	-
		LINEs	-	...+	+	+	+	...	-	-
		СтДНК	-	-	+	+	+	-	-	-
Мультилокусный анализ										
ДНКхДНК гибридизация		-	+	...+	+	+	-	-	-	
RFLP (Barrie et al., 1981); таксонпринт (Федоров и др., 1992)		-	-	...+	+	+	-	-	-	
RAPD (Williams et al., 1990; Welsh et al., 1990, 1991)		-	-	-	-	...+	+	...+	+	
Inter-SINE-PCR (Jurka et al., 1995; Buntjer, 1997)		-	-	-	...+	+	+	...+	...+	
AFLP (Vos et al., 1995)		-	-	-	-	+	+	...+	+	
Фингерпринт – (минисателлиты, Jeffreys et al., 1985)		-	-	-	-	-	+	+	+	
ISSR-PCR (микросателлиты, Zietkiewicz et al., 1994)		-	-	-	-	+	+	+	+	

Примечание: Н/о – надотряд; «+» – маркер пригоден для работы на данном таксономическом уровне; «...+» - использование возможно, но не всегда результативно; «...» - возможности маркера на данном уровне мало исследованы; «-» - маркер не пригоден.

Подписи к рисункам.

- Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения современных отрядов млекопитающих по морфологическим данным (Shoshani, McKenna, 1998).
- Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения млекопитающих по результатам секвенирования полной мтДНК (Arnason et al., 2002). Числа над ветвями указывают значения индекса бутстрэпа.
- Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения млекопитающих по результатам комбинированного анализа 19 ядерных и трех митохондриальных генов (Murphy et al., 2001б). Числа над ветвями – апостериорные вероятности в методе Байеса; числа под ветвями – индексы бутстрэпа. Стрелками указано время дивергенции Afrotheria/Xenarthra+Boeoetheria (103 млн. лет) и Euarchontoglires/Laurasiatheria (88 млн. лет).

## MOLECULAR MARKERS AND MODERN PHYLOGENETICS OF MAMMALS

A.A. Bannikova

Biological Faculty, Moscow Lomonosov State University, Leninskie Gory, Moscow 119992

e-mail: grechko@genome.eimb.relarn.ru

Application of modern molecular techniques such as molecular cloning, sequence and polymerase chain reaction of DNA resulted in the increasing of the resolution of the phylogenetic analysis and enhanced the role of molecular markers in the evolutionary and taxonomic studies. However, certain properties of the molecular markers are to be taken into consideration when results of the molecular phylogenetic analyses are discussed. This survey reviews the advantages and shortages of different molecular markers (mtDNA and nDNA genes, satellite sequences, long and short retrotransposons) at the various taxonomic levels. The most part of new phylogenetic reconstructions are established on the results of mtDNA analysis and must be interpreted cautiously because of non-mendelian inheritance of mitochondrial genome. The extremely rapid rate of nucleotide change in mtDNA as compared with nDNA reinforces the saturation in nucleotide sequence and screens the phylogenetic signal. The analysis of nuclear genomes is constrained by that only truly orthologous genes are suitable for the phylogeny reconstruction. So there is a problem to distinguish genes from pseudogenes. Besides, there are some general problems of gene reconstruction such as nucleotide and amino acid compositional shift, long branch attraction and the choice of outgroup. Short interspersed nuclear elements (SINEs) may provide the most valuable phylogenetic information. The markers of multilocus DNA analysis (RAPD-PCR, IS-PCR, RFLP, ISSR-PCR), their advantages and shortages are also discussed.

A brief survey of the recent studies of molecular phylogeny of mammals for the period of about ten years is presented. The results based on the combined analysis of the mitochondrial and nuclear genes reject the reliability of some of previously recognized supraordinal eutherian taxa in favour of independent range of four main superorder clades: Afrotheria, Xenarthra, Euarchontoglires, and Laurasiatheria. Within these clades, monophyly of some of traditionally recognized orders was proved by molecular data.

The recent advances of molecular phylogenetics are very encouraging. However, its future developments are full of serious difficulties. The problem of accumulation of the data turns into the problem of their correct analysis that is more difficult from the methodological point of view. The careful analysis of the conformities and contradictions between different data sets and looking for congruent conclusions deduced from different characters are the most fruitful way of further phylogenetics development.