

МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ *Phylloscopus examinandus* И ГИПОТЕЗА ЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2022 г. Л. Н. Спиридонова¹, *, О. П. Вальчук¹

¹Федеральный центр биоразнообразия Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

*e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.

После доработки 17.08.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Впервые проведено секвенирование полного митохондриального генома трех гнездовых особей пеночки-таловки *Phylloscopus examinandus* (Stresemann, 1913) (Passeriformes, Phylloscopidae) с о-ва Сахалин. Структура митохондриального генома характерная для рода *Phylloscopus* с двумя контрольными регионами: функциональным CRI и частичным (псевдо-) CRII. Генетическая дивергенция мт-геномов *Ph. examinandus* и *Ph. borealis* (Генбанк), ранее считавшимися подвидами, по нашим данным составила более 4%, что значительно превышает межвидовые значения для птиц (примерно 2%). У одной особи *Ph. examinandus* наряду с таксон-специфичным мт-гаплотипом были обнаружены фрагменты ядерной копии мтДНК, сходные с митохондриальным гаплотипом *Ph. borealis*. Данный факт позволяет рассматривать гипотезу происхождения гаплотипа *Ph. examinandus* из ядерного генома *Ph. borealis* посредством межгеномной рекомбинации, ранее описанного для других воробьиных птиц.

Ключевые слова: митохондриальный геном, *Phylloscopus examinandus*, ядерные копии мтДНК.

DOI: 10.31857/S0016675822030146

Молекулярно-генетические исследования, проводимые для выявления дифференциации близкородственных таксонов, в большинстве случаев основаны на одном митохондриальном гене. Классическим стало использование таких маркеров как цитохром *b*, контрольный регион, реже цитохром-оксидаза I или NADH-дегидрогеназный комплекс. Как было показано ранее для рыбного филина [1], взгляды на систематическую принадлежность птиц по данным молекулярной биологии могут изменяться в зависимости от выбранного метода, исследованного фрагмента ДНК и его длины. Наиболее достоверные результаты для определения филогенетических связей близкородственных таксонов чаще всего бывают получены с применением полного митохондриального генома (митогенома).

Систематика форм, входящих в состав группировки пеночек-таловок *Phylloscopus borealis* (Blasius, JH, 1858) *sensu lato*, представляет собой один из наиболее сложных случаев среди пеночек Северной Палеарктики [2]. В настоящее время признанным результатом анализа гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК (мтДНК) является разделение ранее сложного политипического вида *Ph. borealis* на три самостоятельных формы, при этом вопрос о номенклатурном положении двух

выделенных видов был решен с помощью исследований типовых экземпляров *examinandus* и *xanthodryas* [3], для которых предложены следующие английские названия – Kamchatka Leaf Warbler для *Ph. examinandus*, распространенной в южной части Камчатки, на Курильских островах, Хоккайдо, Сахалине, Japanese Leaf Warbler для *Ph. xanthodryas*, населяющей о-в Хонсю и более южные Японские острова, а для оставшейся части *Ph. borealis*, распространенной в континентальной части Евразии (исключая Камчатку) и на Аляске, предлагается оставить прежнее название Arctic Warbler.

Внутривидовое разнообразие вновь выделенных таксонов до сих пор специально не изучалось, однако не исключено, что в состав *Ph. examinandus* входит несколько разных форм, хорошо отличающихся, по крайней мере, морфологически [4, наши данные], подобно тому, как это многократно отмечено для *Ph. borealis*, включающей до трех–четырёх форм [2, 5]: *Ph. b. talovka*, *Ph. b. borealis*, *Ph. b. transbaicalica*, и *Ph. b. kennicotti*.

Время дивергенции между выявленными филогруппами митохондриальных гаплотипов таловки по гену цитохром *b* с прохождением “бутылочного горлышка” в результате сдвигов и сокращений аре-

алов популяций относят к плиоцену и плейстоцену [6]. Выполненные к настоящему времени генетические исследования представителей данных группировок [3, 6, 7] пока не позволяют выявить характер репродуктивных отношений между ними.

Исследования изменчивости морфологических признаков [4] показали, что таловки с “медленной” песней делятся на две группы, соответствующие также двум географическим расам: более крупную камчатскую (собственно *Ph. b. examinandus* Stresemann, 1913) и занимающую остальную часть гнездового ареала, более мелкую *Ph. b. hylebata* Swinhoe, 1860. По морфологическим данным гнездящаяся популяция сахалинских таловок имеет смешанные признаки и ближе к подвиду *Ph. b. hylebata* [5], однако по данным гена цитохрома *b* сахалинские птицы имеют митохондриальный гаплотип *Ph. b. examinandus* [6]. Интересным моментом является то, что через Восточный Сахалин в массе мигрируют явно камчатские таловки, крупные и имеющие более яркую зеленую окраску оперения. Эти птицы встречаются на побережье в зарослях кедрового стланика, где явно не гнездятся, но регулярно встречаются и после календарного завершения миграции в конце июня—первых числах июля. Поскольку таксономический статус сахалинского подвида до настоящего времени не решен, цель настоящей работы — описание полных митогеномов нескольких экземпляров гнездовых пеночек-таловок с о-ва Сахалин с целью уточнения таксономической принадлежности этой формы.

Материалом для анализа послужили три образца крови гнездовых птиц с о-ва Сахалин: самец от выводка на горе Пик (Ногликский р-н), самец и самка с яйцом в яйцеводе из окрестностей с. Кировское (Тымовский р-н). ДНК выделена с помощью кита DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) по приложенной инструкции. Секвенирование митохондриальных геномов проведено методом пиросеквенирования на Roche GS Junior. Приготовление быстрой библиотеки с лигированными адаптерами, проведение эмульсионной ПЦР, секвенирование с реагентами GS Junior Titanium Series выполнялось согласно инструкциям фирмы-изготовителя прибора и реактивов — 454 LifeScienceCorp., Roche Company, Branford, CT 06405, USA. Покрытие составляло 300–650×. Нуклеотидные последовательности собирали с помощью программы GS De Novo Assembler (<http://454.com/products/analysis-software/index.asp>). Аннотирование проведено с помощью программ Sequin и tRNAscan-SE On-line [8]. Полученные последовательности депонированы в базу данных NCBI под номерами доступа: MK690473, MK695926 и MK695927.

Впервые прочитаны полные митохондриальные геномы трех гнездовых особей с Сахалина. Все птицы имели гаплотип *Ph. examinandus*. Общая длина митогенома для двух птиц составила

16884 пн, у одной из особей в контрольном регионе обнаружена делеция из трех нуклеотидов (16881 пн). Нуклеотидное разнообразие анализируемых митогеномов составило $P_i = 0.00137$, а гаплотипическое — $H = 1$. Неожиданно оказалось, что одна птица имела две отличающиеся нуклеотидные последовательности. Одна из них была таксон-специфичным митохондриальным гаплотипом *examinandus*, а вторая последовательность оказалась ядерной копией мтДНК (NUMT), сходной с митохондриальным гаплотипом *borealis*. Филогенетический анализ по полученным данным полных митогеномов и обнаруженных фрагментов ядерной копии мтДНК общей длиной 3.3 тпн (номер доступа в Генбанке MW143023) проведен совместно с данными, взятыми из Генбанка: *Ph. b. borealis* AB362462; HQ608832; NC045526; *Ph. b. kennicotti* AB362461; *Ph. b. examinandus* AB362463; AB362464; *Ph. b. xanthodryas* AB362465; AB362466. В качестве внешней группы использовались *Ph. borealooides* AB362467; *Ph. occisnensis* MK513447 и *Ph. fuscatu*s NC046416.

Филогенетическое дерево (рис. 1) сконструировано методом максимального правдоподобия (ML) по модели замен GTR + I (BIC = 93686.154) в программе MEGA ver. 7 [9]. Для оценки достоверности ветвлений филогенетического дерева, построенного по методу ML, проводилось 500 репликаций [10]. Реконструкция филогенетических отношений выявила три филогруппы гаплотипов, соответствующие ранее установленным по цитохрому *b* и сгруппировала таловок о-ва Сахалин с *Ph. examinandus*. Обнаруженная ядерная копия мтДНК выделилась в отдельную ветвь, близкую кладе *Ph. borealis*. Причиной сходства ядерной копии мтДНК *Ph. examinandus* с митохондриальным геномом *Ph. borealis* может быть только общий источник их происхождения, т. е. мтДНК. Перенос митохондриальной последовательности в ядерный геном, в результате которого одинаковые последовательности оказались в геномах разных видов, произошел путем гомологичной рекомбинации, описанной ранее у других видов птиц [11–13]. Таким образом, глубокая дивергенция между таксон-специфичными гаплотипами *borealis* и *examinandus* связана с рекомбинационными процессами в ядерном геноме, а не со спонтанным накоплением мутаций в митохондриальном, как предполагалось ранее [3, 6, 7]. Дивергенция ядерной копии мтДНК *Ph. examinandus* с митохондриальным гаплотипом *Ph. borealis* может свидетельствовать о значительном времени пребывания митохондриальной копии в ядерном геноме и происходящих в ней мутациях.

На рис. 2 показано расположение кодирующих генов в митогеноме одной из птиц (№ 8 MK690473). Стрелками обозначены неполные копии генов *COX1*, *COX2*, *ND3*, *ATP6* и *cyt b*, находящихся на обратной цепи в транскрипционной ориентации,

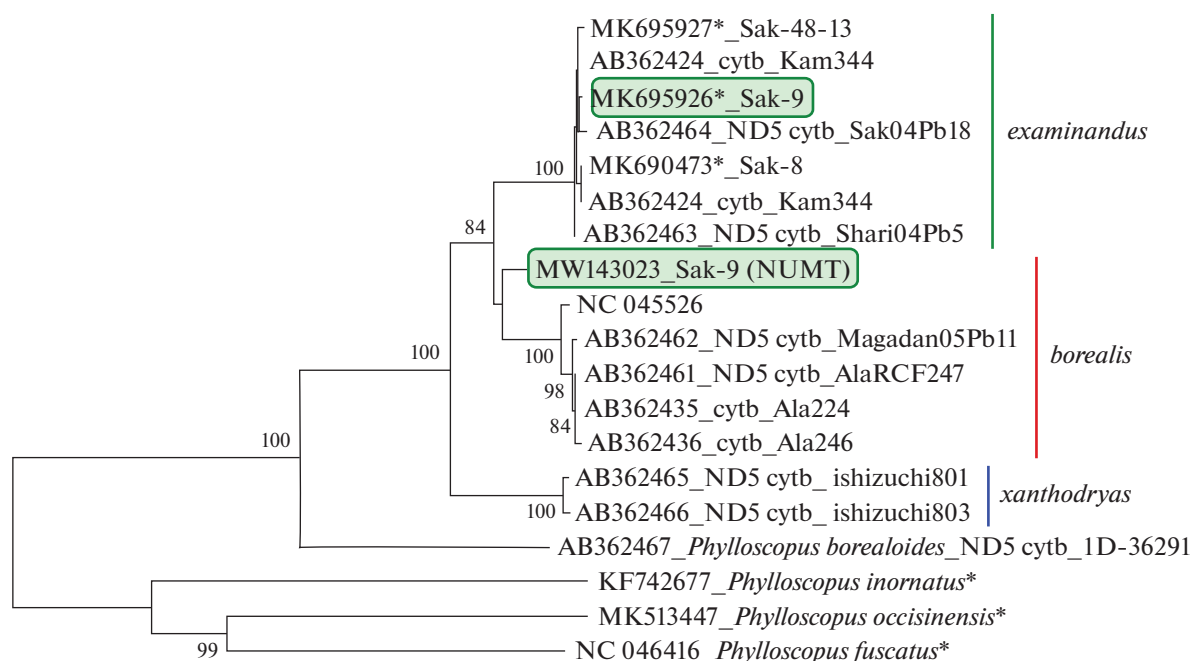


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное по методу ML по полным митохондриальным геномам (*) и частичным фрагментам (ND5–cytb). В узлах ветвлений приведены значения бутстреп-поддержки при 500 повторях (%).

противоположной нормальным генам. Такие псевдогены не пригодны к транскрипции и свидетельствуют о том, что данный митохондриальный геном перешел из ядра в митохондрию, а не наоборот [14].

В настоящее время NUMT обнаружены во всех исследованных в этом отношении растениях и животных. С.Д. Гребельный с соавт. [14] провели анализ хранящихся в Генбанке последовательностей митохондриальных генов из работ по филогенетике разных таксонов и убедительно показали причину этих несоответствий — использование в анализе ядерных копий митохондриальных генов [14]. Сравнение митохондриальных генов и их ядерных копий может пролить свет на происхождение таксон-специфичных митохондриальных гаплотипов, как было показано нами ранее [11–13].

Еще одним свидетельством переноса гомологичной нуклеотидной последовательности именно из ядра в работающую митохондрию, а не наоборот, является, например, то, что у *Hydra oligastis* в ее линейной митохондриальной ДНК имеется непригодная к транскрипции неполная копия *COXI*. Она присутствует на одном конце молекулы, в транскрипционной ориентации, противоположной остальной части гена, входя в состав инвертированного терминального повтора, характерного для линейных мтДНК [15]. Sh. Song с соавт. [16] рассматривают появление интрон-содержащих NUMT как результат переноса в ядро участков мтДНК вместе с находящимися в них интронами. По другому предположению, более вероятно как раз противополож-

ное движение. В процессе рекомбинации ядерного генома интроны ядерных генов попали в уже лежавшие в хромосомах NUMT, а затем благодаря своей гомологии с мтДНК попали в работающие митохондрии, доставив туда несвойственные митохондриальному геному фрагменты интронов, заимствованных из ядра [14].

Таким образом, нами обнаружен еще один факт гомологии между ядерными копиями митохондриального генома одного вида с собственно митохондриальным геномом другого вида, что указывает на существование обмена генетической информацией между ядром и митохондриями. Возникновение гаплотипа *Ph. examinandus* в результате гомологичной рекомбинации между ядерным и митохондриальным геномами у особи *Ph. borealis* проясняет причину существования в природе широкоареальных видов с глубокодивергированными митохондриальными гаплотипами, где имеют место случаи с межгеномной рекомбинацией (*Calliope calliope* s.l., *Calliope pectoralis* s.l.) и видами, не имеющими такой дивергенции (*Motacilla alba* s.l.), т.е. тех, у которых в истории не было межгеномной рекомбинации.

Работа выполнена при поддержке Программы Дальний Восток, проект 15I6079.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

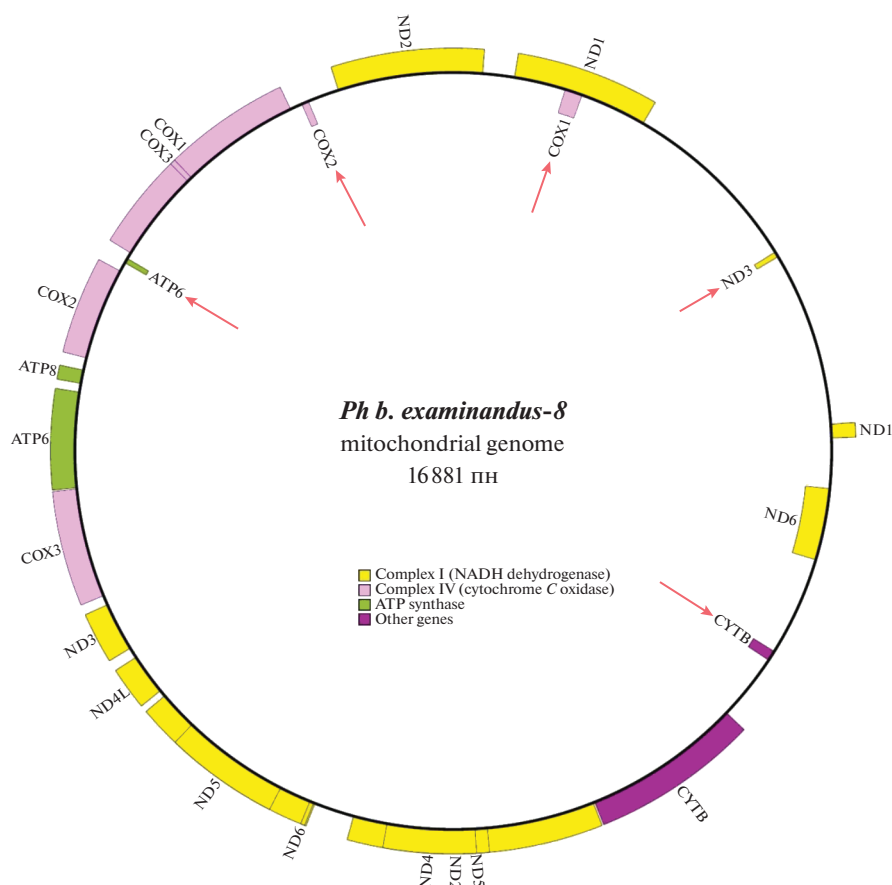


Рис. 2. Схема расположения генов и их неполных копий на обратной цепи митохондриальной ДНК (указаны стрелками), аннотированные в программе GeSeq – Annotation of Organellar Genomes (<https://chlorobox.mpimp-goelm.mpg.de/geseq.html>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спиридонова Л.Н., Сурмач С.Г. Полный митохондриальный геном рыбного филина *Bubo (Ketupa) blakistoni* (Strigiformes, Strigidae) свидетельствует в пользу его возвращения в род *Ketupa* // Генетика. Т. 54. № 3. С. 373–378. <https://doi.org/10.7868/S0016675818030128>
2. Глущенко Ю.Н., Нечаев В.А., Редькин Я.А. Птицы Приморского края: краткий фаунистический обзор. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2016. 523 с.
3. Alström P., Saitoh T., Williams D. et al. The Arctic warbler *Phylloscopus borealis* – three anciently separated cryptic species revealed // Ibis. 2011. V. 153. P. 395–410.
4. Red'kin Ya.A. Geographic variation and reproductive isolation in the eastern populations of arctic warbler // Avian Migrants in the Northern Pacific: Breeding and Stopover Sites in Changing Earth. Yuzhno-Sakhalinsk: 2013. 11 p.
5. Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архитов В.Ю. Список птиц Российской Федерации. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2006. 256 с.
6. Saitoh T., Alstrom P., Nishiumi I. et al. Old divergences in a boreal bird supports long-term survival through the Ice Ages // BMC Evol. Biol. 2010. V. 10(1). № 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-35>
7. Reeves A.B., Drovetski S.V., Fadeev I.V. Mitochondrial DNA data imply a stepping-stone colonization of Beringia by arctic warbler *Phylloscopus borealis* // J. Avian Biol. 2008. V. 39. P. 567–575.
8. Lowe T.M., Chan P.P. tRNAscan-SE On-line: Search and contextual analysis of transfer RNA genes. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. P. 54–57.
9. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis, version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. and Evol. 2016. V. 33. P. 1870–1874.
10. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791.
11. Спиридонова Л.Н., Редькин Я.А., Вальчук О.П., Крюков А.П. Ядерные копии митохондриальных генов – источник новых вариантов гаплотипов гена цитохрома *b* *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves) // Генетика. 2016. Т. 52. № 9. С. 1069–1080. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090137>
12. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А. и др. Филогеография и демографическая история соловья-красношейки *Luscinia calliope* // Генетика.

2017. Т. 49. № 6. С. 735–742.
<https://doi.org/10.7868/S0016675817080100>
13. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А. Новый случай рекомбинации между ядерным и митохондриальным геномами в роде *Calliope* Gould, 1836 (Muscicapidae, Aves): гипотеза происхождения *Calliope pectoralis* Gould, 1837 // Генетика. 2019. Т. 55. № 1. С. 81–93.
<https://doi.org/10.1134/S0016675819010132>
14. Гребельный С.Д., Иванова Н.Ю., Нефедова Е.А. Обмен между ядерным и митохондриальными геномами (по результатам анализа ядерных и цитоплазматических копий митохондриальных генов – *numts* и *cymts*) // Цитология. 2018. Т. 60. № 11. С. 899–902.
<https://doi.org/10.1134/S004137711811007X>
15. Kayal E., Lavrov D.V. The mitochondrial genome of *Hydra oligactis* (Cnidaria, Hydrozoa) sheds new light on animal mtDNA evolution and cnidarian phylogeny // Gene. 2008. V. 410. P. 177–186.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.002>
16. Song Sh., Jiang F., Yuan J. et al. Exceptionally high cumulative percentage of NUMTs originating from linear mitochondrial DNA molecules in the *Hydra magnipapillata* genome // BMC Genomics. 2013. V. 14. P. 447–259.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-447>

Mitochondrial Genome of *Phylloscopus examinandus* and Its Origin Hypothesis

L. N. Spiridonova^{a, *} and O. P. Valchuk^a

^a Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch,
 Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

*e-mail: spiridonova@biosoil.ru

The complete mitochondrial genome sequencing of the three nesting warblers *Phylloscopus examinandus* (Stresemann, 1913) (Passeriformes, Phylloscopidae) from Sakhalin Island was carried out for the first time. The mitochondrial genome structure was typical for the genus *Phylloscopus* with two control regions: functional CRI and partial (pseudo-) CRII. The genetic divergence between *Ph. examinandus* and *Ph. borealis* (GenBank) previously considered as subspecies, amounted to more than 4% according to our data that significantly exceed the interspecific values for birds (about 2%). Besides the taxon-specific mt-haplotype the one specimen of *Ph. examinandus* had a nuclear copy of mitochondrial DNA similar to the mitochondrial haplotype *Ph. borealis*. It allows us to suppose *Ph. examinandus* mt-haplotype origin hypothesis from the nuclear genome of *Ph. borealis* through intergenomic recombination, previously described for other passerines.

Keywords: mitochondrial genome, *Phylloscopus examinandus*, nuclear copies of mtDNA.