

ЯДЕРНЫЕ КОПИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ – ИСТОЧНИК НОВЫХ ГАПЛОТИПОВ ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* мтДНК *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves)

© 2016 г. Л. Н. Спиридонова¹, О. П. Вальчук¹, Я. А. Редькин², А. П. Крюков¹

¹Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток 690022

²Научно-исследовательский зоологический музей
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 125009

e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 21.10.2015 г.

Проанализирован полиморфизм нуклеотидных последовательностей участка гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК у 21 образца подвида *Luscinia calliope calliope* (Pallas, 1776) и двух образцов *L. c. anadyrensis* (Portenko, 1939). На сиквенсных хроматограммах у 19 образцов *L. c. calliope* выявлены двойные пики в таксон-специфичных позициях по типу гетероплазмии. При этом обнаружено два варианта клонов: первый – митохондриальный ген *cyt b calliope*, второй – ядерный псевдоген *cyt b*, сходный с митохондриальным гаплотипом *anadyrensis–camtschatkensis*. У *L. c. anadyrensis* обнаружено четыре варианта клонов: митохондриальные гены *cyt b calliope* и *anadyrensis–camtschatkensis* и ядерные псевдогены *cyt b calliope* и *sachalinensis*. Некоторые ядерные копии гена *cyt b* имеют высокое сходство (98–99%) с митохондриальными генами подвидов *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis*. Однако большинство последовательностей ядерных псевдогенов имеют высокий уровень полиморфизма, обусловленный несинонимичными заменами (до пяти замен на одну последовательность), присутствием в некоторых клонах инделей, ТАА и TGA стоп-кодонов. Митохондриальные гаплотипы *anadyrensis–camtschatkensis* и *sachalinensis* произошли, по нашему мнению, в результате межгеномной гомологичной рекомбинации. Это позволяет по-новому представить историю заселения *L. calliope* северо-восточной части ареала, согласно которой последовательное освоение территорий Чукотки–Камчатки и Сахалина шло в разное время и независимыми путями.

Ключевые слова: *Luscinia calliope*, цитохром *b*, ядерные копии митохондриальных генов, рекомбинация.

DOI: 10.7868/S0016675816090137

Соловей-красношейка *Luscinia calliope* (Pallas, 1776) – широко распространенный перелетный палеарктический вид, внутривидовая структура которого до сих пор трактуется неоднозначно. Одни авторы [1–3] считают его монотипичным, другие [4–6] признают не менее пяти морфологически обособленных географических рас (подвидов) (рис. 1).

Высокогорный по происхождению вид [7] соловей-красношейка к настоящему времени заселил разнообразные местообитания от Предуралья и Уральских гор на западе до Тихоокеанского побережья (Чукотка, Камчатка, Курильские острова, Сахалин и Хоккайдо) на востоке и северо-востоке. На Дальнем Востоке и в Восточной Сибири имеет место диплоясная структура распространения, когда наряду с высокогорными существуют долинные популяции [7–11]. В последние десятилетия наблюдается расширение ареала в юго-восточном направлении. Так, соловей-красношейка найден

в горах Чан Бай Шаня [12] и на Корейском полуострове [13]. Кроме того, имеется указание на гнездование этого вида на севере о. Хонсю [14].

Морфологические и окрасочные различия между подвидами *L. calliope* в разной степени перекрываются. Применение маркеров митохондриальной ДНК (мтДНК) позволило нам выявить дифференциацию подвидов соловья-красношейки и уточнить филогеографическую и популяционную структуру вида [15, 16]. Для мтДНК по сравнению с ядерным геномом характерна высокая скорость мутагенеза, что обусловлено менее точным репаративным аппаратом. В связи с этим появление новых гаплотипов происходит в 5–10 раз быстрее [17], что очень важно в изучении таксонов низкого ранга. По данным секвенирования гена цитохрома *b* (*cyt b*) мтДНК *L. calliope* нами установлено [15, 16], что вид представлен тремя значительно дифференцированными митогруппами: западная соответствует об-

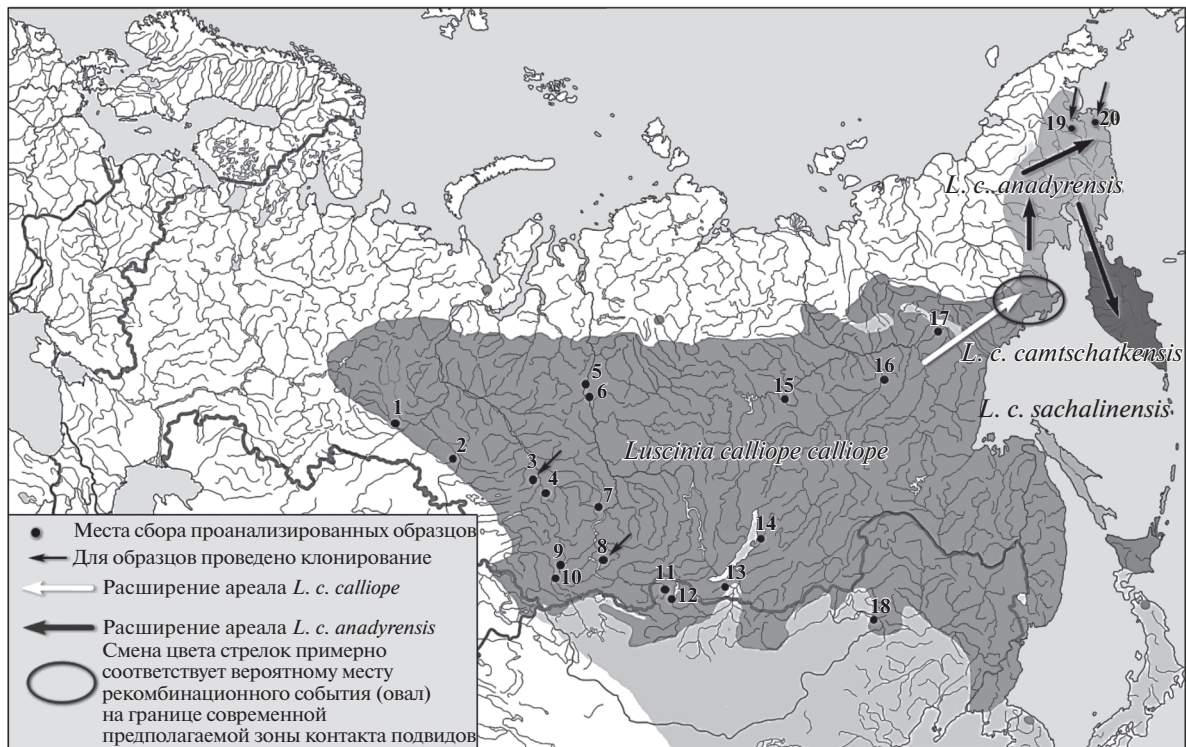


Рис. 1. Ареалы подвидов *Luscinia calliope* и места сбора образцов.

ласти распространения подвида *calliope*; северо-восточная — анадырско-камчатская — населена подвидами *anadyrensis* и *camtschatkensis*, гаплотипы которых сходны; и сахалинская — подвидом *sachalinensis*. В восточной части материкового ареала (Анадырь, Камчатка, Магаданская область, Хабаровский и Приморский край) с разной частотой встречаются гаплотипы и *calliope*, и *anadyrensis*—*camtschatkensis* [16]. Остров Сахалин заселен в основном птицами с гаплотипом *sachalinensis*, но иногда встречаются и два других гаплотипа. На островах Итуруп и Хоккайдо обнаружен исключительно гаплотип группы *anadyrensis*—*camtschatkensis*.

При анализе филогеографических связей митохондриальных гаплотипов *L. calliope* возник ряд необъяснимых вопросов. В частности, почему гаплотипы *calliope* значительно дистанцированы от гаплотипов *anadyrensis*—*camtschatkensis*, хотя географических разрывов между ареалами этих подвидов практически нет. Кроме того, неясным остается происхождение гаплотипа *sachalinensis*, обнаруженного только на о. Сахалин. К настоящему времени предложено несколько гипотез истории формирования ареалов подвидов *L. calliope* [18, 19], однако ни одна из них не может ответить на вышеуказанные вопросы. В связи с этим возникла необходимость провести дополнительные исследования с привлечением образцов из других

частей ареала соловья-красношейки. Поскольку сбор нового материала с огромной западной части ареала от Предуралья до Байкала в настоящее время практически невозможен, мы решили воспользоваться коллекционными сборами Зоологического музея МГУ.

Цели исследования — анализ филогеографии *L. c. calliope* по изменчивости гена *cyt b* мтДНК на расширенной выборке особей из недостаточно исследованной западной части ареала; уточнение истории формирования подвидов и их ареалов в свете полученных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего проанализировано 23 образца *L. calliope* из коллекции Зоологического музея МГУ. Таксономическая принадлежность каждой особи была определена по морфологическим признакам (рис. 1, таблица).

От общего числа образцов 21 принадлежал *L. c. calliope* из 18 локалитетов западной части ареала и два — *L. c. anadyrensis* с Чукотки. Работы с образцами каждого подвида проводились в стерильных условиях и были разделены во времени и пространстве. Индивидуальные препараты тотальной ДНК выделяли из кусочков шкурок, используя набор QIAgen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Inc.) согласно протоколу производителя. ДНК из музей-

Экземпляры *Luscinia calliope* из коллекции Зоологического музея МГУ, использованные в работе

№ п.п.	Инвентарный номер	Номер на карте	Регион	Район	Локалитет	Дата сбора материала
1	R-29237	1	Тюменская обл., РФ	Окр. г. Тюмень	57°09' N; 65°29' E	05.09.1923
2	R-27625	2	Омская обл., РФ	Тарский р-н	окр. г. Тары, Ашировская роша, 56°52' N; 74°24' E	02.06.1907
3	R-94662	3	Томская обл., РФ	Бакчарский р-н	Окр. пос. Карагай, 56°50' N; 82°58' E	03.08.1967
4	R-30046	4	»	Окр. г. Томска	56°29' N; 84°58' E	20.06.1918
5	R-82465	5	Красноярский край, РФ	Туруханский р-н	Устье р. Сургутиха, 63°51' N; 87°21' E	01.07.1956
6	R-82463	6	»	»	Окр. пос. Верхне-Имбатское, 63°08' N; 87°59' E	18.06.1956
7	R-82464	6	»	»	То же	12.06.1956
8	R-97968	7	»	Козульский р-н	Пос. Б. Кемчуг, 56°11' N; 91°35' E	09.07.1960
9	R-92281	8	»	Ермаковский р-н	Бас. р. М. Кебезь, Собачья речка, 52°59' N; 92°58' E	21.07.1960
10	R-123672	9	Республика Хакасия, РФ	Таштыпский р-н	р. Еринат, 51°20.98' N; 88°09.27' E	15.08.1937
11	R-23537	10	Республика Алтай, РФ	Улаганский р-н	р. Суры-Язы (правый приток р. Чульча), 51°10' N; 88°27' E	13.08.1934
12	R-123671	11	Монголия	Хувсгел аймак	Дархатская котловина, 51°06.43' N; 99°45.70' E	21.07.1967
13	R-107011	12	»	»	Верховья р. Бургагийн-Гол, 50°43' N; 100°38' E	26.07.1983
14	R-99709	13	Республика Бурятия, РФ	Кабанский р-н	Хр. Хамар-Дабан, р. Сохор 51°17' N; 105°14' E	03.06.1973
15	R-99710	13	»	»	р. Абидуй, гольцы, 51°17' N; 105°17' E	18.07.1974
16	R-101156*	14	»	Северо-Байкальский р-н	Верховья р. Шумилиха, 54°04' N; 109°37' E	июль 1955 г.
17	R-94775	15	Республика Саха (Якутия), РФ	Сунтарский улус	Окр. пос. Хордогой (Вилюйчан), 62°33' N; 115°40' E	13.06.1965
18	R-87044	16	»	Окр. г. Якутска	30 км севернее 62°22' N; 129°40' E	19.06.1958
19	R-27624	16	»	г. Якутск	61°54.82' N; 129°47.50' E	31.05.1906
20	R-130343*	17	»	Томпонский улус	Хр. Сунтар-Хаята, окр. пос. Развилка, 63°02' N; 138°09' E	14.07.2011
21	R-107009	18	Монголия	Дорнод аймак	Окр. пос. Сумбэр, 47°33' N; 118°32' E	18.07.1977
22	RYA 2053**	19	Чукотский АО, РФ	Анадырский р-н	Окр. пос. Краснено, 64°38' N; 174°17' E	08.06.2006
23	RYA 2251**	20	»	Беринговский р-н	р. Ныкчеквеем, 63°45' N; 176°51' E	16.07.2006

* Образцы, у которых не обнаружен ядерный псевдоген *сyt b* мтДНК гаплогруппы *anadyrensis*—*camtschatkensis*.

** Экземпляры, принадлежащие по морфологическим признакам подвиду *L. c. anadyrensis*; прочие особи принадлежат *L. c. calliope*.

ного материала обычно деградирована и представлена в основном короткими фрагментами с низкой концентрацией, поэтому мы синтезировали три участка гена *cyt b* по 600 пн с участием разных пар праймеров собственного дизайна. Место посадки каждого праймера в полном митохондриальном геноме *L. calliope* (NC_015074) указано в названии праймера в нижнем регистре. Первый фрагмент гена синтезирован с праймерами *cyt b*_L₁₃₆₃₉ 5'-CTTTGCCTTATCCATCCTCAT-3' и *cyt b*_Rv₁₄₂₅₄ 5'-GGAATGGGAGAAGAAAGTGTAG-3'; второй фрагмент – *cyt b*_Fw₁₃₉₅₂ 5'-CCTCATTTTTCTTTATCTGC-3' и *cyt b*_Rv₁₄₅₃₆ 5'-AGTTTGTTTGGGATGAGCG-3'; третий фрагмент – *cyt b*_Fw₁₄₂₃₃ 5'-CTACACTTTCTTCTCCCAT-TCC-3' и *cyt b*_H₁₄₈₈₉ 5'-CTGAAGGTATAACTСТААГААГ-3'. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мкл 10× ПЦР-буфера, 2,5 ммоль MgCl₂, 2 пмоль каждого праймера, 0,2 ммоль каждого dNTP, 1,0 ед. *Taq*-полимеразы (Медиген, Россия) и 1–5 нг тотальной ДНК. Программа амплификации: 94°C – 2 мин; 35 циклов синтеза фрагмента: 94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30–60 с (в зависимости от длины фрагментов); 72°C – 30 мин.

Циклическое секвенирование обеих цепей фрагментов ДНК осуществляли с использованием набора флуоресцентно меченных нуклеотидов (BigDye Terminator v. 3.1, Applied Biosystems) и с теми же праймерами. Нуклеотидные последовательности определяли на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, USA/Hitachi, Japan) и собирали с помощью пакета программ Staden Package v. 1.5 [20].

На сиквенсных хроматограммах большинство последовательностей содержали двойные пики (рис. 2,а). Во избежание ошибок произведен повторный отбор материала и выделена ДНК. Амплификацию и секвенирование фрагментов гена *cyt b* проводили по 2–3 раза. Необходимо было установить и объяснить природу обнаруженной в амплифицированных фрагментах гетерогенности, для чего были рассмотрены две гипотезы – гетероплазмия и ядерные копии мтДНК. Разделение вариантов в гетерогенных фрагментах проводилось с помощью клонирования с использованием набора InsTAclone™ PCR cloning Kit (Fermentas, Litva) в вектор pTZ57R/T согласно инструкции производителя. Трансформацию проводили в компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL1-Blue. В среднем отобрано по 10 клонов от каждого фрагмента. Наличие вставки в клонках проверяли в ПЦР с парой праймеров M13/pUC_{fw} 5'-GCCAGGGTTTCCAGTCACGA-3' и M13/pUC_{rv} 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3' при следующих условиях: 94°C – 2 мин; затем 35 циклов: 94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 1 мин; 72°C –

5 мин. Циклическое секвенирование осуществляли, как описано выше.

Для подтверждения гипотезы о существовании в ядерном геноме *L. c. anadyrensis* копии гена *cyt b* номинативного подвида *L. c. calliope* выполнено тестирование двух образцов *L. c. anadyrensis* из локалитетов 19 и 20 (рис. 1, таблица). Ранее нами в популяциях *L. c. anadyrensis* было обнаружено присутствие двух гаплотипов, что является следствием интрогрессивной гибридизации с *L. c. calliope: anadyrensis* (LK932608) и *calliope* (LK932617), последовательности которых не содержали гетерогенных сайтов [15, 16]. ДНК образцов *L. c. anadyrensis* выделена из фиксированной в 96%-ном этаноле мышечной ткани с помощью набора QIAgen DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Inc.) согласно протоколу производителя. Синтез фрагмента, включающего ген *cyt b* и контрольный регион CR, осуществляли в ПЦР с праймерами *cyt b*_L₁₃₆₃₉ 5'-CTTTGCCTTATCCATCCTCAT-3' и CR t-RNA_{H22} 5'-CCGTCTTGGCATCTTCAGTGC-3'. Затем полученный продукт *cyt b*–CR (3202 пн) был амплифицирован с праймерами: *cyt b*_L₁₃₆₃₉ 5'-CTTTGCCTTATCCATCCTCAT-3' и *cyt b*_H₁₄₈₈₉ 5'-CTGAAGGTATAACTСТААГААГ-3', чтобы обогатить фракцию ядерного гомолога гена *cyt b* длиной 1200 пн. Далее эти фрагменты секвенировали для выявления в них гетерогенных сайтов, затем такие ампликоны клонировали и повторно секвенировали. Все полученные последовательности гена *cyt b* и его ядерных копий депонированы в базу данных EMBL/GenBank под номерами доступа LN874592–LN874634.

Последовательности гена *cyt b* клонированных фрагментов выравнивали в программе ClustalW, предложенной в MEGA ver. 6 [21]. В матрицу данных были включены полученные нами ранее последовательности этого же гена представителей *L. c. calliope* (LK932558, LK932559, LK932560, LK932561, LK932567, LK932569), *L. c. sachalinensis* (LK932662, LK932663, LK932665) и северо-восточной группы *anadyrensis*–*camtschatkensis* (LK932614, LK932629, LK932635). Генеалогические связи гаплотипов анализировали методом Reduce Median (RM) для малого количества образцов в программе Network 4.6 [22, <http://www.fluxus-engineering.com/>].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного анализа 21 музейного образца *L. c. calliope* получены частичные нуклеотидные последовательности гена *cyt b* мтДНК. Визуальное тестирование хроматограмм выявило у 19 образцов двойные пики в ряде позиций по типу гетероплазмии (рис. 2,а), причем именно в позициях, отличающих гаплотип *calliope* от гаплотипа группы *anadyrensis*–*camtschatkensis*.

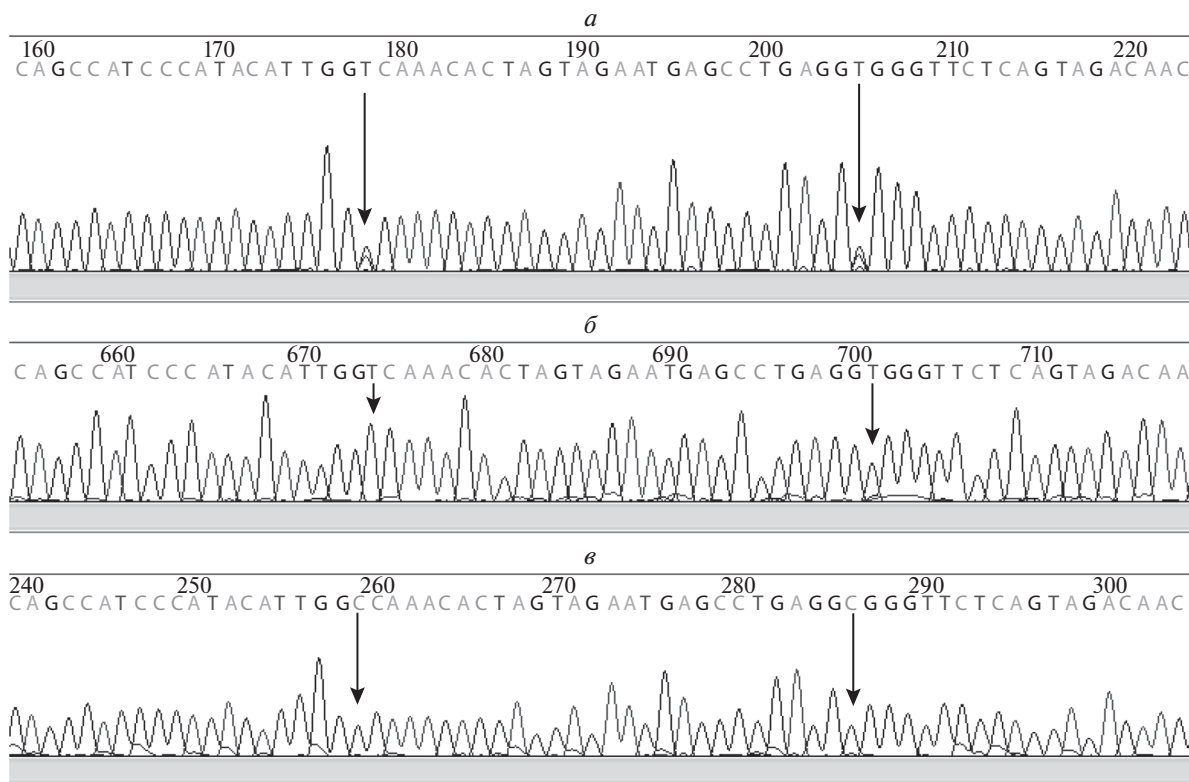


Рис. 2. Графическое изображение участка фрагмента гена *cyt b* мтДНК образца R-94662 *L. c. calliope*: *a* – хроматограмма, содержащая двойные пики в таксон-специфичных позициях по типу гетероплазмии; *б* – хроматограмма клонированного фрагмента, соответствующего гаплотипу номинативного подвида *calliope*; *в* – хроматограмма клонированного фрагмента, являющегося ядерным гомологом гена *cyt b*, сходным с гаплотипом восточной группы *anadyrensis-camtschatkensis*. Стрелками указаны подвидовые таксон-специфичные сайты.

Поскольку все сиквенсы характеризовались идентичным распределением данных таксон-специфичных гетерогенных сайтов, мы произвольно отобрали для дальнейших анализов (клонирование, ПЦР и повторное секвенирование) образцы R-94662 и R-92281 из двух мест в Западной Сибири, удаленных друг от друга примерно на 650 км (таблица).

Всего для этих птиц проанализировано 25 случайно отобранных клонов фрагмента гена *cyt b* (рис. 2, б, в), длина которых после выравнивания составила 867 пн. Средние генетические *p*-дистанции между клонированными последовательностями у образцов R-94662 и R-92881 (0.011 и 0.018 соответственно) оказались в 5–9 раз больше значений таковых (0.002–0.004) внутри филогрупп *L. calliope* [16]. Нуклеотидные замены для большей части клонов в основном несинонимичные и находятся в первой или во второй позиции кодона, что приводит к смене аминокислоты. Например, в последовательности клона с шестью мутациями (рис. 3) образца R-92881 (LN874607) выявлены аминокислотные замены: Ser/Phe₈₉, Trp/Phe₁₆₆, Leu/Phe₂₃₁ и Leu/Phe₂₈₂, а в последовательности клона с 12 мутациями образца RYA2053 (LN874629) – замены Leu/Phe₂₈₂,

Phe/Tyr₃₃₅ и делеция трех нуклеотидов (СТА), что привело к выпадению аминокислоты Leu₅₂. В клонированных последовательностях выявлено до пяти аминокислотных замен, что не характерно для митохондриального гена *cyt b* *L. calliope* [16]. Кроме того, в некоторых последовательностях обнаружены одиночные делеции, которые приводят к сдвигу рамки считывания. Все это однозначно подтверждает ядерную природу этих клонов. Стоп-кодона, характерные для ядерного генома, в ядерных копиях митохондриального гена, кроме уникального терминирующего TGA-кодона (“opal” или “umber”), отсутствуют. TGA-триплет в клонированных фрагментах присутствует в девяти позициях: 93, 96, 234, 342, 408, 426, 492, 498, 819.

18 клонированных последовательностей *L. c. anadyrensis* образцов RYA2053 и RYA2251 имели одинаковые значения межклоновых генетических *p*-дистанций (0.015) и такие же характеристики, как и клонированные последовательности двух образцов *L. c. calliope*, описанные выше. Необходимо отметить, что у образца RYA2053 *L. c. anadyrensis* обнаружены клоны, значительно дивергированные (число нуклеотидных замен –

DNA sequences	Translated protein sequences
Species/Abbriv	
1. 3. (R-94662)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
2. 5. (R-94662)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
3. 6. (R-94662)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
4. 7. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
5. 8. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
6. 10. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
7. 11. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
8. 12. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
9. 13. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
10. 14. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
11. 22. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
12. 23. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
13. 25. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
14. 26. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
15. 27. (R-92281)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
16. 2. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
17. 3. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
18. 4. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
19. 1. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
20. 5. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
21. 7. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
22. 10. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
23. 11. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
24. 12. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
25. 14. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
26. 13. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
27. 15. (RYA-2053)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
28. 1. (RYA-2251)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
29. 2. (RYA-2251)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL
30. 4. (RYA-2251)	ITQIVTGLLLATHYTTADTSLAFNSVAHLRCRNVQFG LIRNLHANGASFFFCIYLHIGRGGFYGGSYLNKET NVGVLLLLALATAPVGVLLR GQMSF GSAVTIHLFSAIPYIGQTLVE GA GGFVSDMPTLL

Site # 43 with w/o Gabs Edit disabled for translated protein data

Рис. 3. Фрагмент выровненных последовательностей гена *su/b* с 43-й по 177-ю аминокислотные позиции от некоторых клонов четырех образцов *L. salicore*. Темным цветом выделены аминокислотные замены, звездочкой отмечены стоп-кодоны при использовании стандартного генетического кода.

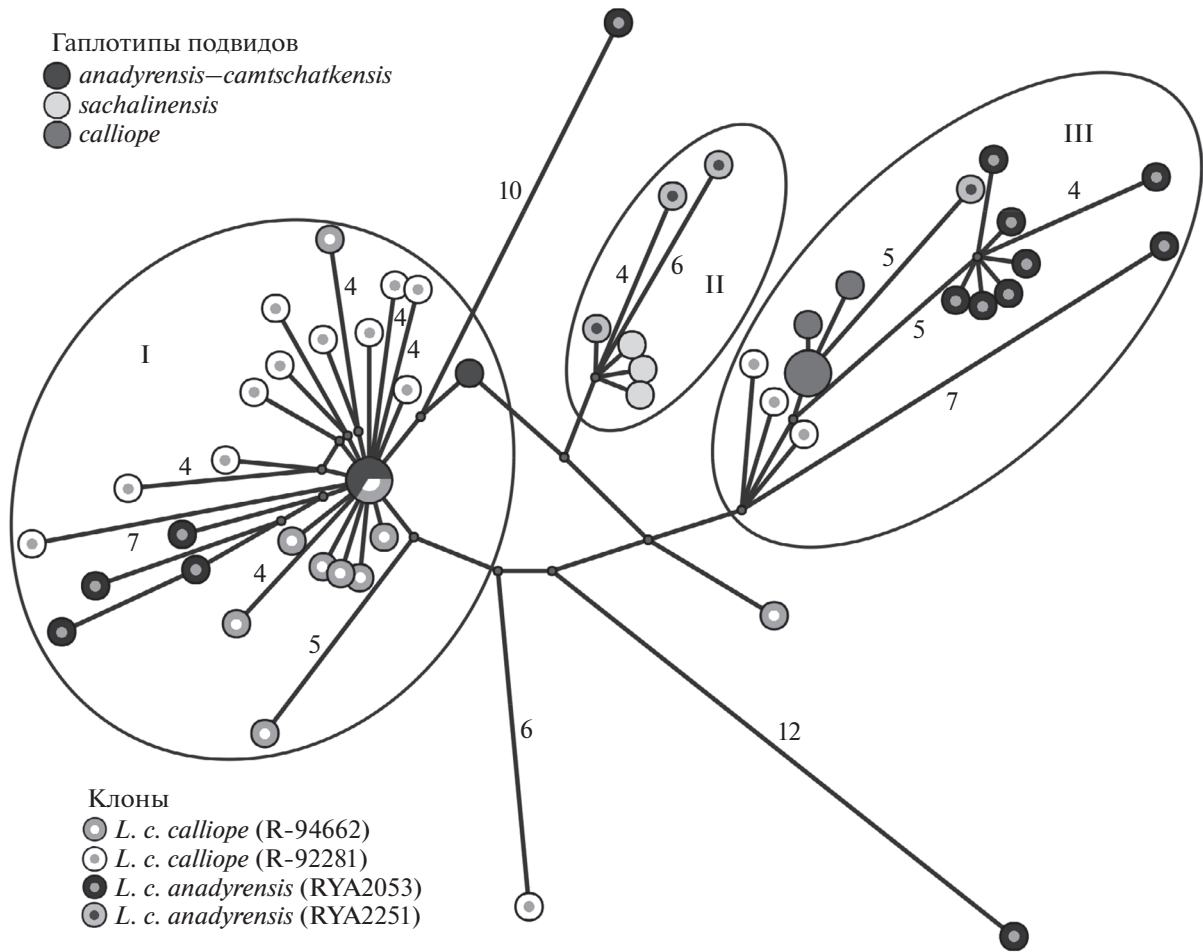


Рис. 4. Генеалогическая сеть гаплотипов фрагмента гена *cyt b* представителей *L. calliope*. I – кластер гаплотипов *anadyrensis*–*camtschatkensis*, II – *sachalinensis* и III – *calliope*. Размер окружностей отражает частоту встречаемости гаплотипов, маленькие черные кружки – гипотетические гаплотипы, цифры рядом с ветвями указывают на число мутаций между гаплотипами в случаях, когда число нуклеотидных замен между гаплотипами больше трех.

7, 10 и 12) от соседних гаплотипов (рис. 4). В двух клонах присутствует триплет ТАА, выполняющий в митохондриальном геноме функции терминирующего кодона, в позициях 223 и 967 у образцов RYA2251 и RYA2053 соответственно. Необходимо отметить, что некоторые из обнаруженных ядерных копий гена *cyt b* имеют высокое сходство (98–99%) с митохондриальными генами подвидов *L. c. anadyrensis* и *L. c. camtschatkensis*.

Для выявления генеалогических связей между гаплотипами методом RM построена сеть, в которой выделяются три хорошо обособленных кластера (рис. 4). Последовательности 14 клонов образца R-92281 *L. c. calliope* распределились в кластеры I и III, а один клон оказался удаленным от всех групп более чем на 6 нуклеотидных замен. Несколько клонированных последовательностей образца R-94662 *L. c. calliope* полностью идентичны базовому гаплотипу гена *cyt b* филогруппы *anadyrensis*–*camtschatkensis*, а остальные отстоят

от него на 1–5 замен. Таким образом, выявлены два варианта клонов образца R-92281 *L. c. calliope*: один, по-видимому, является митохондриальным геном *cyt b* номинативного подвида *calliope*, а второй вариант – ядерным псевдогеном *cyt b*, сходным с митохондриальным гаплотипом подвидов группы *anadyrensis*–*camtschatkensis*.

14 клонов образца RYA2053 *L. c. anadyrensis* (гаплотип *anadyrensis*) оказались наиболее гетерогенными. Четыре клона вошли в филогруппу *anadyrensis*–*camtschatkensis* (кластер I), семь – в *calliope* (кластер III). Два клона с наибольшим числом мутаций 7 и 10 сгруппированы с разными гаплогруппами I и III и могут быть включены в них условно. Наиболее мутировавший (12 замен) клон образца RYA2053 расположен за пределами всех кластеров (рис. 4). Три клона особи RYA2251 (гаплотип *calliope*) объединились во II кластере и один в III. Итак, последовательности клонов от каждого образца *L. c. anadyrensis* также были двух

вариантов: у образца RYA2053 один из вариантов клонов это гаплотип гена *cyt b* группы *anadyrensis*–*camtschatkensis*, второй – ядерная копия гена *cyt b* подвида *L. c. calliope*; у RYA2251 – гаплотип гена *cyt b* номинативного подвида *L. c. calliope* и ядерная копия, идентичная гаплотипу гена *cyt b* подвида *L. c. sachalinensis*, который ранее [16] не был обнаружен где-либо за пределами о. Сахалин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нуклеотидные последовательности гена *cyt b* у 19 из 21 музейного образца *L. c. calliope* имели двойные пики в таксон-специфичных позициях, что указывает на гетерогенную природу фрагментов. Для дальнейшего обсуждения полученных результатов необходимо ответить на вопрос: какова природа этой гетерогенности – гетероплазмия мтДНК или ядерные копии митохондриального гена *cyt b*? Признаки, отличающие истинную гетероплазмю от ядерных копий, включают следующие альтернативы: источник происхождения (митохондриальный или ядерный геном) и, как следствие, функционирующий (белок-кодирующий) ген или молчащий (ядерный псевдоген); отсутствие/присутствие терминирующих кодонов; а также наличие инделей, приводящих к сдвигу рамки считывания, и повышенный полиморфизм последовательностей за счет несинонимичных замен.

Как правило, гетероплазмю можно увидеть в случае наиболее различающихся материнских гаплотипов и в редких случаях отцовского наследования, а также при использовании разных тканей для выделения ДНК. Наши исследования проводились на одном типе тканей, что уменьшает вероятность гетероплазмии. Проведенный нами анализ гена *cyt b* мтДНК у более 200 образцов *L. c. calliope* (в том числе и из популяций, имеющих несколько гаплотипов), ДНК которых была выделена из фиксированных в этаноле мышечных тканей и крови, никогда не выявлял гетероплазмии [15, 16], что позволяет говорить об отсутствии таковой у этого вида.

Анализ нуклеотидных последовательностей 25 клонов *L. c. calliope* показал, что многие из них сходны с митохондриальными гаплотипами гена *cyt b* других подвидов и характеризуются высоким нуклеотидным разнообразием. Три гаплотипа (рис. 4) оказались наиболее дистанцированы от всех гаплогрупп. Средние генетические дистанции клонов от каждого из двух образцов составляют 0.011 и 0.018, в то время как для вида в целом они равны 0.016, что в 4 раза больше средних внутривидовых дистанций (0.004) по данному маркеру для отряда Passeriformes [23]. Высокий уровень нуклеотидного разнообразия, обусловленный хаотично распределенными мутациями и присутствием в некоторых клонах инделей и ТАА

стоп-кодонами, подтверждает их ядерную природу. Кроме того, большое разнообразие клонов во всех кластерах на сети (рис. 4) указывает на сходные процессы (высокий уровень мутирования), происходящие в ядерных геномах разных подвигов соловья-красношейки.

Большинство клонов *L. c. calliope* имели последовательность, идентичную гаплотипу гена *cyt b* группы *anadyrensis*–*camtschatkensis*, который не должен был присутствовать у птиц из западной части ареала *L. c. calliope* (рис. 4, кластер I, центральный гаплотип). Еще один способ объяснить природу клонированных последовательностей как псевдогенов состоит в показе наличия в них терминирующих кодонов. Сравнивая стоп-кодонами ядерного и митохондриального геномов, мы пришли к заключению, что возникновение стоп-кодонов при переходе митохондриального фрагмента в ядерную ДНК и обратно происходит удивительно просто – за счет разных функций одного и того же уникального TGA-кодона. В зависимости от того, в каком геноме находится TGA-триплет, он может либо кодировать аминокислоту триптофан (мтДНК), либо играть роль терминирующего фактора (ядерная ДНК). В нашем случае в последовательности фрагмента гена *cyt b* оказалось девять TGA-кодонов. После предполагаемого обмена гомологичными участками активный в митохондриальном геноме рекомбинантный фрагмент автоматически становится в ядерном геноме неактивным, т.е. псевдогеном (Nuclear copies of Mitochondrial genes, NUMT). Также не требуется каких-либо случайных мутаций и длительного времени, чтобы молчащий ядерный псевдоген стал активным в мтДНК.

Множество примеров [24–28] свидетельствуют как о возможности рекомбинации практически любых по размеру фрагментов мтДНК с ядерной ДНК, судя по их значительной гомологии, так и о непредсказуемости последствий и масштабов этого явления. Более того, функционирование и эволюция митохондриального и ядерного геномов сцеплены, поскольку энергетический обмен в клетке контролируется комплексами, в которые входят как ядерные, так и митохондриальные белки, с ведущей регуляторной функцией ядра [29].

Обнаруженные нами ядерные копии мтДНК косвенно указывают на то, что митохондриальные гаплотипы подвидов *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis* произошли путем симметричной рекомбинации гомологичных участков ядерного и митохондриального геномов с последующим распространением рекомбинантных гаплотипов в популяции по типу эффекта основателя [30, 31]. Выше показано, что у *L. c. calliope* выявлены два варианта клонов: ген *cyt b calliope* и ядерный псевдоген *cyt b*, сходный с митохондриальным гаплотипом

anadyrensis—*camtschatkensis*, у *L. c. anadyrensis* — четыре варианта клонов: гены *cyt b calliope* и *anadyrensis*—*camtschatkensis* и ядерные псевдогены *cyt b calliope* и *sachalinensis*. Наличие многих вариантов клонов можно объяснить присутствием нескольких копий псевдогенов в ядерной ДНК (как это показано, например, для трех видов ящериц [32]), которые могут располагаться на разных хромосомах (у *L. calliope* 84 хромосомы) [33]. По всей видимости, в данных случаях произошел обмен участка мтДНК *calliope* на гомологичные ядерные копии *anadyrensis*—*camtschatkensis* и *sachalinensis*. Можно предположить, что ядерный геном исходного номинативного подвида *L. c. calliope*, содержащий разнообразные копии митохондриальных генов, в частности гена *cyt b*, появившиеся в результате межгеномной рекомбинации либо вставок, в ходе последующих гомологичных обменов явился источником новых вариантов митохондриальных гаплотипов, со временем ставших таксон-специфичными.

Вероятность возникновения одинаковых сложных молекулярных переносов сразу у нескольких особей крайне низка. Мы полагаем, что гомологичное рекомбинационное событие для каждого подвида произошло однократно на первых стадиях формирования половых клеток [34]. Митохондрии предшественников половых клеток составляют всего 0.01% от всего начального пула митохондрий зиготы, что сильно сокращает разнообразие мтДНК [35, 36]. В ряде работ на изолированных митохондриях показано существование явления импорта ядерной ДНК в митохондрии [37, 38]. Возможно, транспорт ДНК в митохондрии является обратимым процессом (импорт/экспорт) и может поставлять материал для возникновения NUMTs (личное сообщение Ю.М. Константинова).

Для случая *calliope*—*anadyrensis*—*camtschatkensis* межгеномный обмен нуклеотидными последовательностями произошел, возможно, в зоне современного контакта *L. c. calliope* с *L. c. anadyrensis* на северо-восточной периферии ареала подвида *L. c. calliope* при низкой численности особей (рис. 1). Новый гаплотип закрепился во времени и по мере заселения новых территорий на северо-востоке Азии стал таксон-специфичным. В настоящее время в популяциях соловья-красношейки бассейна Анадыря и Корякского нагорья при стабильности морфологических признаков, свойственных анадырскому подвиду, выявлено смещение митохондриальных гаплотипов *calliope* и восточного рекомбинантного гаплотипа *anadyrensis*—*camtschatkensis* примерно в равных соотношениях. Далее к югу, на полуострове Камчатка, популяции *L. c. camtschatkensis* представлены особями преимущественно с рекомбинантным гаплотипом *anadyrensis*—*camtschatkensis*, тогда как гаплотип *calliope* встречается очень редко. Предполага-

емым местом рекомбинационного события для случая *calliope*—*sachalinensis* был Сахалин, поскольку митохондриальный гаплотип сахалинского подвида встречается исключительно на этом острове. Все эти рекомбинации произошли, по нашему мнению, относительно недавно, так как обнаруженные ядерные копии гена *cyt b* имеют высокое сходство (98—99%) с митохондриальными генами подвидов *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis*. Известно [39], что степень гомологии ядерных псевдогенов с мтДНК может варьировать от незначительной до полного сходства. Это зависит от длительности пребывания митохондриальной копии в ядерном геноме — чем выше гомология фрагментов, тем они более молоды [26]. Ядерные копии гена *cyt b L. c. calliope* высоко гомологичны митохондриальным гаплотипам подвидов восточной группы: *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis* и *L. c. sachalinensis*, следовательно, предполагаемая рекомбинация произошла относительно недалеко в прошлом.

Обратное предположение о внедрении восточного гаплотипа в ядерный геном *L. c. calliope* мы считаем маловероятным по нескольким причинам: во-первых, значительная удаленность мест, где обнаружен ядерный псевдоген (Западная Сибирь), от гнездового ареала *L. c. anadyrensis*; во-вторых, высокий гнездовой консерватизм и постоянные пути миграций соловья-красношейки. Кроме того, расширение ареала *L. calliope* происходило с запада на восток [18, 19, 40]. К тому же, по нашим данным [16], собственно восточный митохондриальный гаплотип не встречен западнее Благовещенска, кроме одного случая в Монголии.

Для ряда широко распространенных в Палеарктике видов птиц, таких как полевой жаворонок *Alauda arvensis* [41], большой пестрый дятел *Dendrocopos major* [42], пеночка-таловка *Phylloscopus borealis* [43], некоторые врановые *Corvidae* [44], и других таксонов установлено наличие нескольких значительно дивергированных групп митохондриальных гаплотипов. Обычно они разделяются по географическому принципу на западные и восточные, что традиционно объясняют последствиями оледенений, приводивших к обособлению популяций в условиях длительной изоляции в удаленных рефугиумах, где накапливались мутации. В свете полученных нами данных дивергенция гаплотипов может получить новое объяснение. В условиях непрерывных ареалов при определенном стечении описанных выше обстоятельств случайные межгеномные рекомбинации гораздо быстрее приводят к появлению новых вариантов митохондриальных гаплотипов, по сравнению с процессами спонтанных мутаций в самом митохондриальном геноме, и могут представлять собой альтернативную причину таких различий. Кроме того, псевдогены мтДНК в ядерном геноме

чаще, чем сама мтДНК, подвергаются рекомбинационным перестройкам. Это подтверждается высокой вариабельностью клонированных последовательностей у исследованных птиц (рис. 3) и может служить еще одной причиной появления новых вариантов митохондриальных генов в результате межгеномного обмена. Ядерные копии мтДНК могут быть источником новых таксон-специфичных митохондриальных гаплотипов, что указывает на их значение в микроэволюционных процессах и формообразовании. Поэтому, несмотря на общепринятое мнение о негативной роли ядерных копий митохондриальных генов [35, 45], наши данные показывают потенциальную значимость изучения последовательностей NUMT для филогеографических и филогенетических исследований.

Таким образом, в данной работе при изучении полиморфизма гена *cyt b* мтДНК у подвидов *L. c. calliope* и *L. c. anadyrensis* впервые делается предположение о существовании гомологичной рекомбинации ядерного и митохондриального генома и роли ядерных копий мтДНК как источника новых вариантов гаплотипов. Установлено происхождение гаплотипов группы *anadyrensis*—*camtschatkensis* и *sachalinensis*, которое позволило по-новому взглянуть на историю заселения территорий восточной части ареала *L. calliope*. Разные частоты встречаемости подвидовых гаплотипов *calliope*: *anadyrensis*—*camtschatkensis* на Чукотке (1 : 1) и Камчатке (1 : 4) указывают на последовательное освоение этих территорий птицами с разными гаплотипами. Заселение о. Сахалин шло отдельной ветвью независимо от северо-восточного направления, а длительная временная изоляция популяции *sachalinensis* способствовала фиксации нового рекомбинантного гаплотипа и последующему его распространению по всему острову.

Авторы выражают благодарность академику Ю.Н. Журавлеву за внимание к нашим исследованиям и ценные замечания, К.В. Рожковану за методические советы по клонированию, М.М. Козыренко за помощь в редактировании рукописи, А.А. Мосалову и Е.А. Коблику за помощь в подготовке картосхемы распространения соловья-красношейки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 16-04-01304) и гранта РНФ 14-50-00029 “Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vaurie Ch.* The Birds of the Palearctic Fauna. A Systematic Reference. Order Passeriformes. London: H.F & G. Witherby Limited, 1959. 762 p.
2. *Степанян Л.С.* Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий. М.: Академкнига, 2003. 808 с.
3. *Dickinson E.C., Christidis L.* The Howard & Moore Complete Checklist of the Birds of the World: Passerines. 4th ed. V. 2. U.K.: Aves Press. Eastbourne, 2014. 752 p.
4. *Портенко Л.А.* Фауна Анадырского края. Птицы. Ч. 1 // Тр. Науч.-исслед. ин-та полярного земледелия, животноводства и промысл. хоз-ва. Серия Промысловое хоз-во. 1939. Т. 5. С. 126–128.
5. *Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.Ю.* Список птиц Российской Федерации. М.: Тов-во научных изд. КМК, 2006. 281 с.
6. *Stresemann E., Meise W., Schonwetter M.* Aves Beickiana. Beiträge zur Ornithologie von Noerdwest-Kansu nach den Forschungen von Walter Beick in den Jahren 1926–1933 // J. Ornithologie. 1937. V. 85. P. 375–576.
7. *Назаренко А.А.* Летняя орнитофауна высокогорного пояса Южного Сихотэ-Алиня // Экология и фауна птиц юга Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1971. С. 90–126.
8. *Долгушин И.А.* Птицы Казахстана. Т. III. Алма-Ата: АН КазССР, 1970. С. 610–613.
9. *Кищинский А.А.* Птицы Корякского нагорья. М.: Наука, 1980. 336 с.
10. *Лобков Е.Г.* Гнездящиеся птицы Камчатки. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. 290 с.
11. *Щербаков Б.В.* Соловей-красношейка *Luscinia calliope* на Западном Алтае // Русский орнитол. журн. 2009. Т. 18. Экспресс-выпуск 503. С. 1376–1379.
12. *Cheng T.-H.* Distribution List of Chinese Birds. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1976. 366 p.
13. *Rhim Sh.-J., Hur W.-H., Lee Ch.-B. et al.* Characteristics of vegetation structure in breeding area of Siberian rubythroat (*Luscinia calliope*) in Daecyeongbong peak, Mt. Seoraksan national park, South Korea // J. Forestry Res. 2002. V. 13. P. 239–240.
14. Check-List of Japanese Birds, 7th revised ed. // The Ornithological Society of Japan: Sanda, 2012. 438 p.
15. *Спирidonova Л.Н., Вальчук О.П., Белов П.С., Масловский К.С.* Внутривидовая генетическая дифференциация соловья-красношейки (*Luscinia calliope*): данные секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 735–742.
16. *Spiridonova L.N., Valchuk O.P., Red'kin Ya.A. et al.* Complex phylogeographic distribution of mtDNA haplotypes of Siberian rubythroat // Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics / Intern. Symp., Sept. 2–6 2013. Vladivostok, 2013. P. 68–69.
17. *Гречко В.В.* Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематике // Генетика. 2002. Т. 38. № 8. С. 1013–1033.
18. *Назаренко А.А.* К истории орнитофауны субальпийского ландшафта гор Сибири и Дальнего Востока // Зоол. журн. 1979. Т. 58. С. 1680–1691.
19. *Доржиев Ц.З.* Вероятная история становления современного ареала и экология соловья-красношейки в Северной Азии // Сибирская орнитоло-

- гия. Вып. 4. Улан-Удэ: Бурят. гос. ун-т, 2006. С. 68–94.
20. *Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R.* A New DNA Sequence Assembly Program // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. P. 4992–4999.
 21. *Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. P. 2725–2729. doi 10.1093/molbev/mst197
 22. *Bandelt H.J., Forster P., Rohl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
 23. *Guo H., Niu L., Ma Y., Bai S.* Phylogenetic relationships of 34 passerines based on mitochondrial cytochrome *b* sequences // *Acta Ecol. Sinica.* 2010. V. 30. P. 304–309. doi 10.1016/j.chnaes.2010.08.011
 24. *Hazkani-Covo E., Graur D.* A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 13–18. doi 10.1093/molbev/msl149
 25. *Viljakainen L., Oliveira D.C., Werren J.H., Behura S.K.* Transfers of mitochondrial DNA to the nuclear genome in the wasp *Nasonia vitripennis* // *Insect Mol. Biol.* 2010. V. 19. P. 27–35. doi 10.1111/j.1365-2583.2009.00932.x
 26. *Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W.* Molecular poltersgeites: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genome // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. e10000834. doi 10.1371/journal.pgen.1000834
 27. *Газуев А.И., Шайхаев Г.О.* Ядерные митохондриальные псевдогены // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. С. 405–417.
 28. *Zhang D.-X., Hewitt G.M.* Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers // *Trends Ecol. Evol.* 1996. V. 11. P. 247–251.
 29. *Castellana S., Vicario S., Saccone C.* Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes // *Genome Biol. Evol.* 2011. V. 3. P. 1067–1079. doi 10.1093/gbe/evr040
 30. *Спиридонова Л.Н., Редькин Я.А., Вальчук О.П.* Ядерные псевдогены мтДНК как источник новых вариантов митохондриальных генов на примере соловья-красношейки *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves) // *ДАН.* 2016. Т. 466. № 4. С. 487–492. doi 10.7868/S0869565216040241
 31. *Spiridonova L.N., Valchuk O.P.* NUMTs as a source of new mtDNA haplotypes: Siberian rubythroat *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves) case // *Modern Achievements in Population, Evolutionary and Ecological Genetics / Intern. Symp., Sept. 1–10 2015. Vladivostok,* 2015. P. 72–73.
 32. *Pavličev M., Mayer W.* Multiple copies of coding as well as pseudogene *c-mos* sequence exist in three lacertid species // *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.).* 2006. V. 306 (B). P. 539–550.
 33. *Bulatova N.S., Panov E.N.* Comparative analysis of karyotypes of 18 species family Turdidae (Aves) // *Caryologia: Intern. J. Cytol., Cytosyst. Cytogenet.* 1973. V. 26. № 2. P. 229–244.
 34. *Стрижикова С.В., Стрижиков В.К., Житенко Н.В.* Гистогенез яичников у птиц в пренатальном периоде онтогенеза // *Успехи соврем. естествознания.* 2002. Т. 4. С. 77–78.
 35. *White D.J., Wolff J.N., Pierson M., Gemmell N.J.* Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 4925–4942. doi 10.1111/j.1365-294x.2008.03982.x
 36. *Shoubridge E.A., Wai T.* Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2007. V. 77. P. 87–111.
 37. *Weber-Lotfi F., Koulintchenko M.V., Ibrahim N. et al.* Nucleic acid import into mitochondria: New insights into the translocation pathways // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1853. P. 3165–3181. doi 10.1016/j.bbabi.2008.11.001
 38. *Boesch P., Ibrahim N., Dietrich A., Lightowers R.N.* Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. P. 1478–1488. doi 10.1093/nar/gkp1143
 39. *Гречко В.В.* Проблемы молекулярной филогенетики на примере отряда чешуйчатых рептилий (отряд Squamata): митохондриальные ДНК-маркеры // *Молекуляр. биология.* 2013. Т. 47. № 1. С. 61–82.
 40. *Назаренко А.А.* Рецензия: I. Newton. The Speciation and Biogeography of Birds. London: Acad. Press, 2003 // *Орнитология.* 2004. Т. 31. С. 302–308.
 41. *Zink R.M., Pavlova A., Drovetski S., Rohwer S.* Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species // *J. Ornithol.* 2008. V. 149. № 3. P. 399–413. doi 10.1007/s10336-008-0276-z
 42. *Zink R.M., Drovetsky S.V., Rohwer S.* Phylogeographic patterns in the great spotted woodpecker *Dendrocopos major* across Eurasia // *J. Avian Biol.* 2002. V. 33. P. 175–178.
 43. *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. № 35. [http://www.biomedcentral.com/1471-2148/10/35] doi 10.1186/1471-2148-10-35
 44. *Haring E., Gamauf A., Kryukov A.* Phylogeographic patterns in widespread corvid birds // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2007. V. 45. № 3. P. 840–862. doi 10.1016/j.ympev.2007.06.016
 45. *Bernt M., Braband A., Schierwater B., Stadler P.F.* Genetic aspects of mitochondrial genome evolution // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013. V. 69. P. 328–338. doi 10.1016/j.ympev.2012.10.020

**Nuclear mtDNA Pseudogenes as a Source of New Variants
of the mtDNA Cytochrome *b* Haplotypes: A Case Study
of Siberian Rubythroat *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves)**

L. N. Spiridonova^a, O. P. Valchuk^a, Ya. A. Red'kin^b, and A. P. Kryukov^a

^a*Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia*
e-mail: spiridonova@biosoil.ru

^b*Zoological Museum, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 125009 Russia*

Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA cytochrome *b* gene fragment was analyzed in 21 specimens of subspecies *Luscinia calliope calliope* (Pallas, 1776) and two specimens of *L. c. anadyrensis* (Portenko, 1939). On sequence chromatograms, in 19 specimens of *L. c. calliope*, double peaks of heteroplasmy type in the taxon-specific positions were revealed. Moreover, two clone variants were identified. The first variant was the *calliope* mitochondrial *cyt b* gene and the second was the nuclear *cyt b* pseudogene, similar to the mitochondrial haplotype *anadyrensis-camtschatkensis*. In *L. c. anadyrensis*, four clone variants, represented by the mitochondrial *calliope* and *anadyrensis-camtschatkensis cyt b* genes and nuclear *calliope* and *sachalinensis cyt b* pseudogenes, were identified. Some nuclear *cyt b* pseudogenes were highly similar (98–99%) to the mitochondrial genes of the subspecies *L. c. anadyrensis*, *L. c. camtschatkensis*, and *L. c. sachalinensis*. However, the majority of nuclear pseudogene sequences were characterized by a high level of polymorphism, caused by nonsynonymous substitutions (up to five substitutions per sequence), the presence of indels in some of the clones, and TAA and TGA stop codons. In our opinion, the mitochondrial haplotypes *anadyrensis-camtschatkensis* and *sachalinensis* occurred as a result of intergenomic homologous recombination. This finding provides a new insight into the colonization history of the northeastern part of the range by *L. calliope*, according to which successive development of the territory of Chukotka, Kamchatka, and Sakhalin took place at different times and along the independent pathways. English translation of the paper published in Russian Journal of Genetics, 2016, Vol. 52, No. 9, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com>.

Keywords: *Luscinia calliope*, cytochrome *b*, nuclear mtDNA pseudogenes, recombination.