

УДК 575.17:599.323.4

НЕСОГЛАСОВАННОСТЬ РАСПРОСТРАНЕНИЯ МАРКЕРОВ РАЗНЫХ СИСТЕМ НАСЛЕДОВАНИЯ (я-, мтДНК И ХРОМОСОМЫ) В НАДВИДОВОМ КОМПЛЕКСЕ *Mus musculus* КАК СЛЕДСТВИЕ ОБШИРНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В ПРИМОРЬЕ

© 2011 г. Л. Н. Спиридонова, К. В. Киселев, К. В. Коробицына

Учреждение Российской академии наук Биологический-почвенный институт

Дальневосточного отделения РАН, Владивосток 690022;

e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 27.02.2010 г.

Исследована генетическая структура восьми популяций *Mus musculus* L. Приморского края с использованием таксон-специфичных маркеров разных систем наследования: яДНК (RAPD), мтДНК (D-петля) и хромосомы. В результате исследования оказалось, что сравниваемые ядерные маркеры признаки (яДНК и хромосомы), хотя и имеют одну и ту же основу, не связаны между собой и, более того, часто противоречат друг другу. Несогласованность наследования маркерных признаков у большинства исследованных особей является следствием обширной гибридизации, в которой участвуют от двух до четырех подвидов домовой мыши. Для идентификации таксон-специфичных ядерных признаков, выявленных методом RAPD, проведено их клонирование и секвенирование, установлены места их локализации на хромосомах. Показано, что некоторые сходные по размеру фрагменты состоят из двух разных ко-мигрирующих последовательностей, которые локализованы на различных хромосомах и принадлежат разным подвидам. Все секвенированные анонимные признаки локализованы в белок-кодирующих генах. Установлено функциональное значение генов, в состав которых входят маркерные последовательности. Отличия в таксон-специфичных RAPD-фрагментах связаны с изменениями в структуре важных функциональных генов и это можно отнести к значимым генетическим маркерам.

Гибридные зоны предоставляют уникальный материал для исследования микроэволюционных процессов в природных популяциях. Генетические аспекты гибридизации и сами гибридные зоны животных и растений в большинстве случаев изучены недостаточно. Для некоторых видов насекомых, птиц и грызунов показано, что в случаях гибридизации таксон-специфичные характеристики разных систем наследования (хромосомные, ядерные и митохондриальные) распределяются по ареалу не одинаково [1–7]. Результаты по разным молекулярным маркерам часто не согласуются как между собой, так и с морфологическими данными [8–10]. Некоторые исследования указывают на более быструю интрогрессию мтДНК по сравнению с ядерными генами [1–3, 11]. Подобное явление подчеркивает необходимость параллельного анализа яДНК, мтДНК и хромосом для изучения генетической структуры популяций, в особенности в зонах гибридизации [6, 12]. Современные молекулярно-генетические методы позволяют в ряде случаев выявить скрытую (не проявленную фенотипически) гибридизацию, определить и направление интрогрессии тех или иных генов, установить генетическую дискретность таксонов, а использование нескольких ти-

пов маркеров существенно повышает информативность результатов [9, 13].

Одним из примеров животных, обладающих межподвидовой гибридизацией, является домовая мышь *Mus musculus* Linnaeus, 1758. Применение современных генетических методов привело к пересмотру ее систематики по всему ареалу. Надвидовой комплекс *M. musculus* хорошо изучен на территории Евразии, особенно в европейской части, в Закавказье и Японии, где находятся зоны гибридизации его разных форм. Восточноазиатская часть ареала *M. musculus* на территории России интенсивно изучается на уровне биохимических, хромосомных, митохондриальных маркеров, ПДРФ яДНК [14–19]. Однако результаты по разным типам маркеров для одних и тех же животных часто не совпадают, что приводит к противоречиям при их сравнении. Следовательно, описание популяционной структуры по одному типу маркеров не отражает действительного генетического разнообразия в зонах гибридизации подвидов домовой мыши и для повышения надежности результатов необходимо использование нескольких независимых генетических характеристик [12].

Поиск адекватных таксон-специфичных генетических признаков разных систем наследования и их корреляция друг с другом представляет трудную задачу, осложняющуюся явлениями гибридизации изучаемого надвидового комплекса. На территории Дальнего Востока, и в особенности Приморья, домовая мышь в этом отношении представляет собой уникальный объект, поскольку здесь одновременно участвуют в гибридизации от двух до четырех ее подвидов [18, 19 и мн. др.]. Синантропность и способность расселения любыми транспортными средствами, характерные для этих животных, не только размыли "условные" географические границы подвидовых ареалов на Дальнем Востоке, но и значительно перемешали генетические характеристики у каждой отдельно взятой особи. Большинство исследуемых нами точек служат переходными пунктами в перемещении домовых мышей с территорий соседних государств и обратно, а животные из этих точек имеют наибольшую генетическую изменчивость [4].

Основной целью нашей работы стала попытка разрешения вопроса о таксономическом соответствии маркеров разных систем наследования друг другу. Настоящая работа представляет собой обобщение результатов многолетних исследований популяций домовой мыши Приморского края (1998–2006 гг.), полученных с использованием разных молекулярно-генетических подходов на одних и тех же образцах. Задачей исследования стало сравнение по разным таксон-специфичным признакам (я-, mtДНК и хромосомы) каждого отдельно взятого животного для выяснения достоверной картины генетической структуры популяций домовой мыши в условиях обширной гибридизации в Приморье. В предыдущих работах, используя произвольные праймеры, мы выявили низкую молекулярно-генетическую дифференциацию подвидов домовой мыши (значения D_N изменялись от 0.09 до 0.14), однако нам удалось обнаружить таксон-специфичные для подвидов *M. musculus* RAPD-фрагменты [4]. Поскольку этот тип признаков имеет статус анонимных последовательностей и используется с осторожностью, то для идентификации некоторых обнаруженных RAPD-маркеров и определения мест размещения их на хромосомах, а также установления функционального значения было проведено их клонирование и секвенирование.

В нашей работе впервые предпринята попытка объединить разные типы таксон-специфичных признаков для данного объекта и дать полную картину генетической структуры популяций домовых мышей Приморья. В результате этого исследования оказалось, что сравниваемые признаки, хотя и имеют одну и ту же основу (ядНК и хромосомы), не связаны между собой и, более того, часто противоречат друг другу. Мы попыта-

лись с помощью методов клонирования и секвенирования найти связь между разными типами маркеров, что в дальнейшем может быть использовано для более корректного выбора подвидовых характеристик ядерного и хромосомного уровней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы животных и выделение ДНК. Материал для исследования представлен 75 образцами из 8 точек Приморья (таблица). Кроме того, в работе использован материал, любезно предоставленный д-ром Х. Сузуки (Тайвань – 1 обр. *castaneus*; Япония, институт RIKEN – 2 обр. *domesticus*), д-ром К. Аплином (Бангладеш, Мьянма – 4 обр. *castaneus*), проф. Тсуцией (Непал – 2 обр. *bactrianus*).

ДНК получали солевым методом из печени, фиксированной в 70%-ном этаноле [20].

RAPD-анализ. Для обнаружения ядерных подвидоспецифичных маркеров в анализируемых популяциях были применены ранее подобранные шесть десятинуклеотидных случайных праймеров ("Fasmac", Япония) с различной последовательностью и 60–70%-ным содержанием (G + C) пар. PCR проводили по описанной ранее методике [4]. Для получения достоверной повторяемости амплификации маркерных фрагментов было проведено от 2 до 4 PCR-реакций. RAPD-продукты разделяли электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с использованием 1×красителя GelRed ("Biotium"), в 0.5 × ТВЕ-буфере и анализировали в гель-документирующей системе "BioRad" (США). В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер M26 (Сибэнзим, Россия).

Клонирование и секвенирование RAPD-маркеров проводили на базе Юннаньского университета и Института зоологии Куньминя АН Китая, пров. Юннань, и частично – на базе БПИ ДВО РАН. Маркерные фрагменты были извлечены из 1%-ного агарозного геля и очищены с помощью набора QIAGEN (для выделения ДНК из агарозных гелей) по методике производителя. Всего было очищено семь OPC-07₁₂₀₀-фрагментов для *castaneus* ($n = 5$) и *bactrianus* ($n = 2$), а также два OPC-07₁₀₁₀-фрагмента для *domesticus* ($n = 2$), которые использовались для клонирования. ТА-клонирование RAPD-фрагментов проводили с помощью набора "TaKaRa" (Япония) согласно инструкции производителя. Для легирования использовали вектор pMD18-T. Трансформацию проводили в компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α. Было отобрано от 6 до 10 клонов для каждого фрагмента. В целом проанализирован 71 клон. Для проверки клонов на предмет наличия вставки использовали праймеры B0012 (5'-CGCCAGGGTTTC-CCAGTCACGAC-3') и B0013 (5'-AACAGCTAT-

Распространение подвидовых маркеров я-, mtДНК и кариотипов *M. musculus*

№ п/п	Место сбора материала	№ об- разцов	ядНК	мтДНК	Карио- тип ³	№ п/п	Место сбора материала	№ об- разцов	ядНК	мтДНК	Карио- тип ³
1	Хасан, Хасанский р-н (n = 6)	724	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>gans</i>	42	Иннокен- тьевка, Лесо- заводской р-н (n = 13)	792	<i>dom</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
2		726	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>gans</i>	43		793	<i>mus</i>	<i>dom</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>
3		744	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>	44		794	<i>dom</i>	<i>dom</i> ¹	<i>mus</i>
4		745	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>gans</i>	45		795	<i>dom</i>	<i>mus</i> ²	<i>cas (dom?)</i>
5		746	<i>cas</i>	<i>cas</i> ¹ (R)	<i>mus (cas?)</i>	46		796	<i>mus</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
6		758	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>gans</i>	47		797	<i>dom</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
7	Краскино, Хасанский р-н (n = 9)	725	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans × cas</i>	48		798	<i>dom</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
8		729	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans × cas</i>	49		799	<i>mus</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
9		730	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans × mus</i>	50		800	<i>dom</i>	<i>dom</i> ¹	<i>mus</i>
10		731	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	51		801	<i>dom</i>	<i>dom</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>
11		733	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>	52		802	<i>dom</i>	<i>dom</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>
12		736	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>cas</i>	53		803	<i>dom</i>	<i>mus</i> ¹	—
13		737	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus × cas</i>	54		804	<i>mus</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
14		738	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans</i>	55	Погранич- ный, Погра- ничный р-н (n = 8)	805	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus × cas</i>
15		739	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus × cas</i>	56		806	<i>gans × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
16	Владивосток (n = 17)	101	<i>mus × cas</i>	<i>cas</i> ¹	—	57		807	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>
17		102	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	58		808	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>
18		643	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	—	59		809	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
19		644	<i>mus × cas</i>	<i>cas</i> ¹	—	60		810	<i>gans × cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>
20		750	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>cas (dom?)</i>	61		811	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
21		770	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>	62		812	<i>gans</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
22		769	<i>cas × mus</i>	<i>mus</i> ¹	—	63	Чугуевка, Чу- гуевский р-н (n = 7)	853	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>
23		11	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	64		854	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>cas (dom?)</i>
24		13	<i>mus</i>	<i>cas</i> ¹	—	65		856	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>cas (dom?)</i>
25		791	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	—	66		857	<i>dom</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>cas (dom?)</i>
26		0606	<i>mus × cas</i>	<i>cas</i> ¹	—	67		858	<i>mus × gans</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>cas (dom?)</i>
27		0607	<i>cas</i>	<i>cas</i> ¹	—	68		875	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>mus</i>
28		0608	<i>mus × cas</i>	<i>cas</i> ¹	—	69		876	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>
29		0609	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	70		859	<i>mus</i>	<i>mus</i> ²	<i>cas (dom?)</i>
30		0610	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹	—	71	Булыга-Фаде- ево, Чугуев- ский р-н (n = 6)	860	<i>cas × gans</i>	<i>mus</i> ¹ (R)	<i>mus</i>
31		0633	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	72		861	<i>mus × gans</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus? dom?</i>
32		195	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	73		862	<i>cas</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
33	Турий Рог, Ханкайс- кий р-н (n = = 9)	TP104	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—	74		863	<i>mus × gans</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
34		747	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹	—	75		864	<i>mus</i>	<i>mus</i> ²	<i>mus</i>
35		749	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	—						
36		751	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans</i>						
37		752	<i>mus × cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans</i>						
38		753	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans</i>						
39		754	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	<i>gans × cas</i>						
40		755	<i>cas</i>	<i>mus</i> ¹	—						
41		756	<i>mus</i>	<i>mus</i> ¹	<i>cas (dom?)</i>						

Примечание. 1 – собственные результаты, (R) – повтор 76 пн в D-петле, 2 – Yonekawa et al., 2003 [19], 3 – Якименко и др., 2000 [18].

GACCATG-3') при следующих условиях: преднатуррация – 5 мин/94°C, затем 32 цикла: денатурация – 30 с/94°C, отжиг – 30 с/55°C, синтез – 1 мин/72°C, окончательный синтез – 7 мин/72°C.

Анализ последовательностей предполагаемых маркеров. Для определения мест положения на хромосоме все полученные последовательности были депонированы в базу данных NCBI с использованием программы Blast.

Секвенирование контрольного региона mtДНК. Для определения подвидовой специфичности mtДНК нами проведено прямое секвенирование полноразмерного участка гена D-петли mtДНК (1200 пн) для 52 образцов домовой мыши. Для секвенирования D-петли использовали праймеры [21]: L15320: (5'-ATTACTCTGGTCTTGTAAACCC-3'), H00072: (5'-TATAAGGCCAGGACCAAACCT-3'). Кроме того, привлечены литературные данные по короткому высоковариабельному участку D-петли mtДНК (266 пн) для 9 образцов [19].

Амплификацию проводили на приборе фирмы "Biometra", Германия (UNO II – Thermoblock 48). Концентрация тотальной ДНК в пробе составляла 40–60 нг. Амплификацию фрагмента проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержала: 67 мМ трис-HCl, pH 8.8, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% твин-20, 2.5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ dNTP-смеси, 0.2 мМ каждого из праймеров ("Синтол", Москва, Россия) и 1 ед. *Taq*-полимеразы в следующих условиях: преднатуррация – 2 мин/94°C, затем 35 циклов: денатурация – 1 мин/94°C, отжиг – 30 с/39°C, синтез – 2 мин/72°C, окончательный синтез – 6 мин/72°C. Продукты амплификации использовали для циклического секвенирования с набором реагентов ABI PRISM®BigDye™ Terminator v. 3.1. Условия циклического секвенирования включали преднатуррацию – 95°C/1 мин, затем 25 циклов: денатурация – 95°C/30 с; отжиг – 55°C/10 с; элонгация – 60°C/3 мин. Для секвенирования использовали модели автоматических лазерных секвенаторов ABI PRISM 310 и 3130 (на базе БПИ ДВО РАН).

Анализ данных. Последовательности собирали, используя пакет программ Staden [22]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей было проведено с помощью программы ClustalW, предложенной в MEGA ver. 4. Полученные данные статистически обрабатывали с помощью набора пакета программ MEGA ver. 4 [23].

После автоматического выравнивания была проведена незначительная ручная корректировка, затем нуклеотидные последовательности использовали для филогенетических построений по методам максимальной эволюции (ME) и объединения ближайших соседей (NJ). Для этих ана-

лизов использовали молекулярную модель максимального смешанного правдоподобия как сумму относительных логарифмических правдоподобий (maximum-composite likelihood). Для подтверждения устойчивости ветвлений по всем филогенетическим тестам проводились 1000 бутстреп репликаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярный анализ и идентификация RAPD-маркеров

Электрофорограммы RAPD-спектров ДНК домовых мышей из анализируемых точек в основном были сходными (рис. 1). Для некоторых маркирующих подвиды *M. musculus* анонимных RAPD-фрагментов установлены первичные последовательности (рис. 2). Всего проанализирован 71 клон для девяти особей. Сравнительный анализ всех клонов не входил в задачи данного исследования и станет предметом следующей работы. На данном этапе нас интересовал только количественный и качественный состав последовательностей подвидоспецифичных RAPD-фрагментов. Большинство из них, по отобранным клонам, были представлены одной и той же последовательностью и только три фрагмента включали две разные ко-мигрирующие последовательности. Так, для фрагмента OPC-07₁₂₀₀, маркирующего *castaneus*, используя данные ГенБанка, обнаружено место его локализации на 1-й хромосоме в гене *Aff3* (AF4/FMR2 family, member 3). Этот ген кодирует белок, являющийся транскрипционным фактором. Установлено, что клоны шести животных (*cas* – Тайвань, Мьянма, Бангладеш, Непал; *dom* – Япония, RIKEN) из девяти по данному маркерному фрагменту были гомогенными. Клоны трех других мышей имели единичные случаи включения иных последовательностей. Причем особи, идентифицированные как генетически "чистые", содержали в данном RAPD-фрагменте клоны от других подвидов. Например, особь из Бангладеш имела из проверенных клонов шесть на первой хромосоме, характеризующих *castaneus*, и два – на 13-й хромосоме, обнаруженных у *domesticus*. Таким образом, проанализированный фрагмент у этого животного состоял из двух ко-мигрирующих последовательностей от разных подвидов. В другом случае особь, определенная как генетически "чистый" подвид *domesticus* (лабораторная линия RIKEN), имела исключительно последовательность, характеризующую подвид *castaneus*, что может быть объяснено отдаленными гибридизационными событиями в их предковых линиях. У одного животного из Мьянмы клонированный фрагмент

был представлен двумя разными последовательностями, находящимися на 1-й (общей последовательности для всех *castaneus*) и 7-й (уникальной последовательности) хромосомах. Также интересно отметить наличие маркеров *castaneus* у особей из Непала, определенных как подвид *bactrianius* по морфологическим характеристикам и мтДНК (см. рис. 2).

Анализ восьми клонов фрагмента OPC-07₁₀₁₂, выявленного у подвида *M. m. domesticus*, показал, что в его состав входят две разные последовательности. Одна из них локализуется на 13-й хромосоме (шесть клонов) и входит в состав гена, кодирующего фактор транскрипции GAS 1 (growth arrest specific 1), а вторая – на 17-й хромосоме (два клона) и входит в состав гена, кодирующего гипотетический белок, сходный с пигментным белком сетчатки.

Также мы обнаружили сходные по длине фрагменты OPD-06₇₂₈ у особей подвида *castaneus* и *domesticus*. Для фрагмента от подвида *domesticus* было проанализировано три клона (одна особь), а для фрагмента от *castaneus* – пять клонов (одна особь). Оказалось, что сходные по размеру фрагменты имели разные последовательности и локализовались на разных хромосомах. Фрагмент OPD-06₇₂₈ от *domesticus* локализовался на 11-й хромосоме и входил в состав гена, кодирующего белок Sf3a (splicing factor 3a, subunit 1). Такой же длины фрагмент для *castaneus* состоял из двух разных ко-мигрирующих последовательностей, локализованных на 1-й и 4-й хромосомах. Идентификация последовательности на первой хромосоме не установлена по причине отсутствия данных исследуемого региона хромосомы в Генбанке. Фрагмент на четвертой хромосоме был частью гена, кодирующего неизвестный гипотетический белок.

Сравнительный анализ геногеографии ядерных, митохондриальных и кариологических маркеров

В результате проведенного исследования домовых мышей выявлены значительные различия по составу подвидовых характеристик ядерного, митохондриального генома и хромосом. Только 25% животных имели полное совпадение признаков подвидовой принадлежности для обоих геномов и лишь у 11.8% животных молекулярно-генетические характеристики соответствовали кариологическим. Остальные обладали различными комбинациями я-, мт- и хромосомных маркеров (см. таблицу, рис. 3).

Хасан. Наибольшее число таких совпадений выявлено у животных Хасана. Здесь отмечено одинаковое соотношение я-маркеров *musculus*

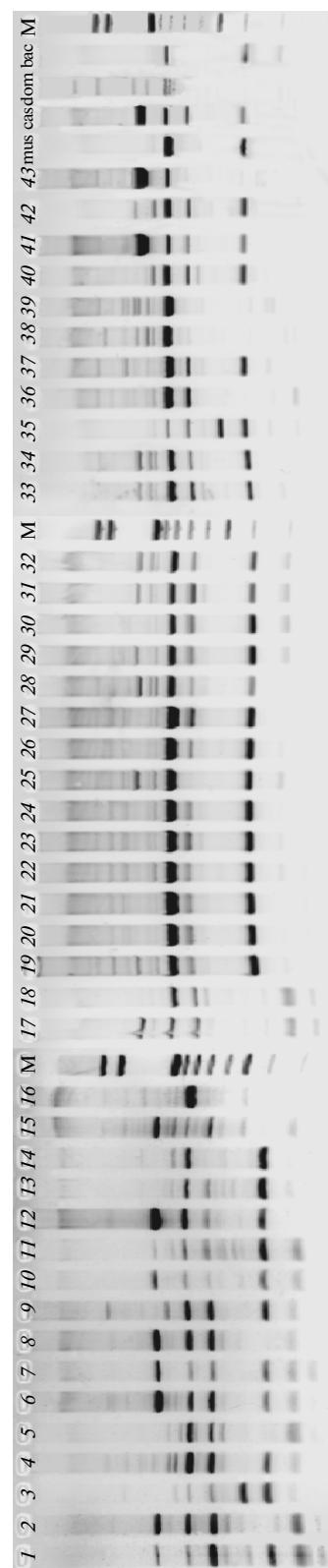


Рис. 1. RAPD-спектры ДНК *M. musculus*, амплифицированные праймером OPC-07: 1–18 – Владивосток; 19–28 – Красokino; 29–34 – Хасан; 35–43 – Турий Рог; “стандарты подвидов”: mus – *M. m. musculus*; cas – *M. m. castaneus*; dom – *M. m. domesticus*; bac – *M. m. bactrianius*; M – маркер 26M.

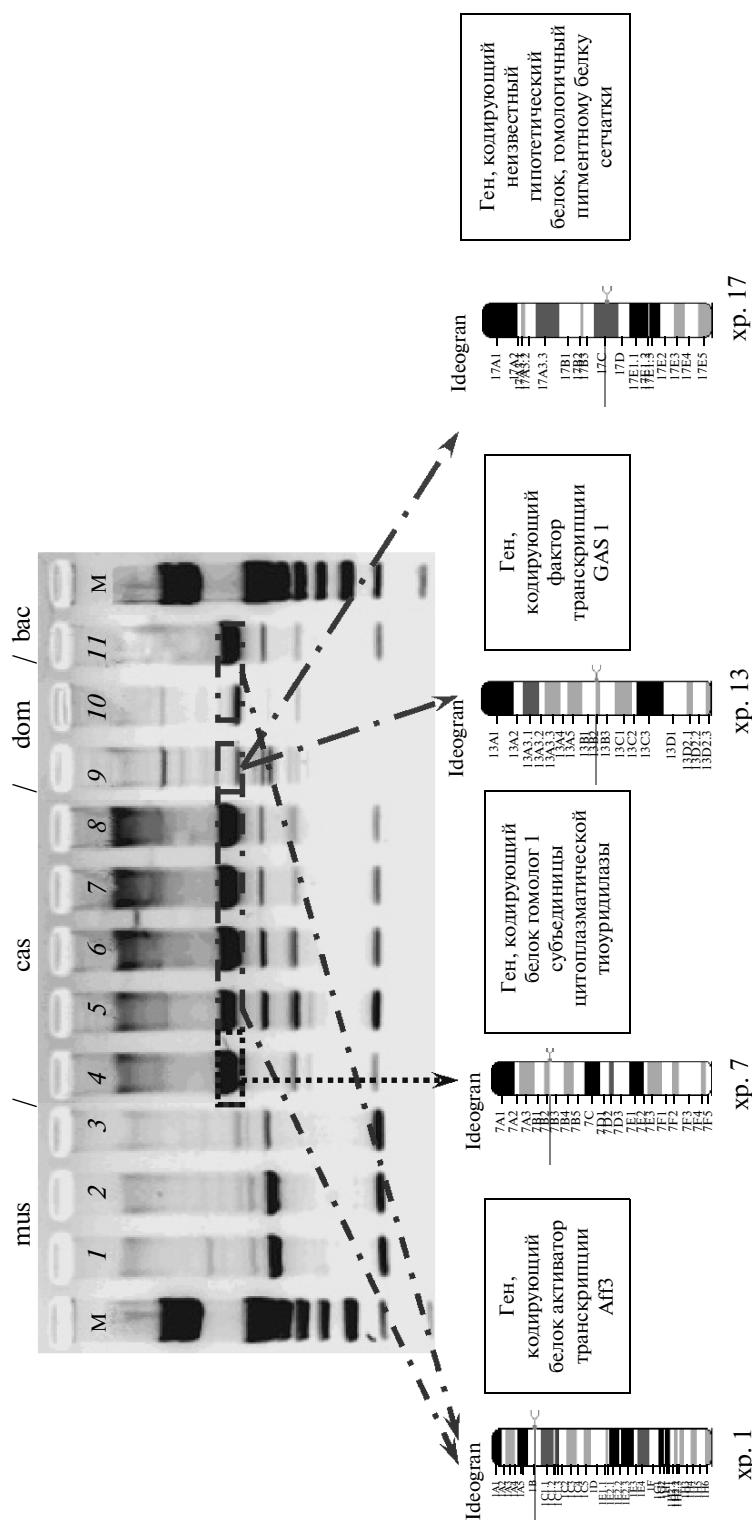


Рис. 2. Положение маркерных RAPD-фрагментов *castaneus* и *domesticus* на хромосомах. Образец № 5 соответствует *cas* на рис. 1, образец № 9 соответствует *dom* на рис. 1.

(*mus*) и *castaneus* (*cas*) с доминированием гаплотипа *mus* по мтДНК. По цитогенетическим данным, кроме кариоморф *mus* и *cas* в Хасане отмечены маркерные хромосомы *M. m. gansuensis* (*gan*).

Одним из вопросов, возникшим в ходе данного анализа, стал вопрос о наличии у подвида *gansuensis* собственного гаплотипа. Секвенирование высоковариабельного участка D-петли мтДНК

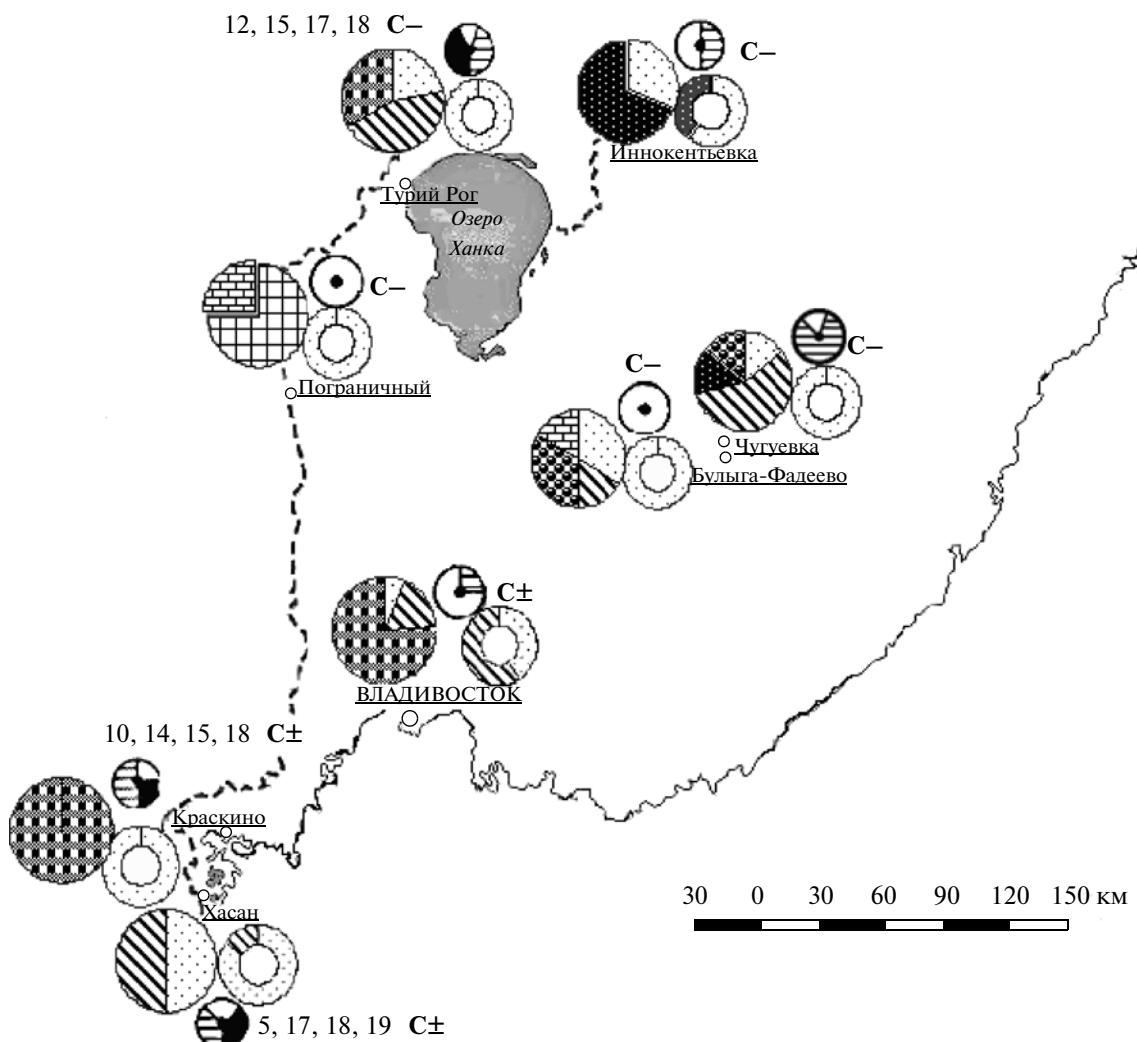


Рис. 3. Распространение подвидоспецифичных ядерных (круглая диаграмма) и митохондриальных (кольцевая диаграмма) маркеров домовых мышей в Приморье: – mus; – cas; – dom; – gan; – cas × gan; – mus × cas; – mus × gan; кариологические характеристики (маленькая диаграмма) (по [18]): – mus, – gans, – cas. Цифры обозначают номера маркерных хромосом; C–, C± – варианты C-окрашивания X-хромосом.

(266 пн) животных из мест Кяхта (Бурятия) и Царучей (Читинская обл.), где обитают особи, морфологически и кариологически типизированные как *gansuensis*, не выявило отличного от *musculus* гаплотипа мтДНК. В настоящем исследовании домовые мыши, несущие кариологические признаки *gansuensis* и проанализированные нами на предмет собственного гаплотипа, также не обнаружили иных гаплотипов, помимо *musculus*.

Иннокентьевка. Здесь были обнаружены два типа маркеров: *musculus* и *domesticus* (см. таблицу, рис. 3). Соотношение ядерных признаков для *mus* и *dom* составило 31 и 69% соответственно, а для митохондриальных оказалось примерно обрат-

ным – 61 и 39% соответственно (соб. данные, [19]). Результаты анализа хромосом обнаружили равное соотношение характеристик *mus* и *dom* (либо *cas*). Поскольку *castaneus* и *domesticus* имеют сходные кариотипы, вопрос о присутствии в Иннокентьевке каждого из этих подвидов (по хромосомным маркерам) остался открытым.

Краскино и Турий Рог. Особи из этих местностей оказались сходными по набору подвидовых ядерных и митохондриальных признаков (*mus* и *cas*), однако имелись противоречия с результатами кариологических исследований, которые выявили наличие маркерных хромосом иного подвида (*gan*) у исследованных особей (см. таблицу,

рис. 1). По молекулярно-генетическим маркерам яДНК в Краскино обнаружены только гибридные животные *mus × cas* (100%), а в Турьем Роге кроме гибридов *mus × cas* (34%) — животные с признаками одного из подвидов: *mus* или *cas* (22 и 44% соответственно).

Пограничный. В выборке домовых мышей из Пограничного наблюдались противоречивые результаты по ядерным признакам (*gan* — 80% и *gan × cas* — 20%), с одной стороны, и митохондриальным и кариологическим данным (*mus* — 100%) — с другой.

Владивосток, Чугуевка, Булыга-Фадеево. Наиболее генетически гетерогенными по ядерным признакам оказались мыши из Чугуевки (*mus* — 14%, *cas* — 57%, *dom* — 14%, *mus × gan* — 14%) и Булыга-Фадеево (*mus* — 33%, *cas* — 17%, *cas × gan* — 17%, *mus × gan* — 33%). Данные хромосомных исследований зафиксировали в Чугуевке лишь кариотипы *musculus* и *castaneus* с доминированием последнего, а в Булыга-Фадеево — только кариотип *musculus*. Животные Чугуевки и Булыга-Фадеево принадлежали по мтДНК к подвиду *musculus*. Животные Владивостока имели соотношение по мтДНК: *mus* и *cas* — 57 и 43% соответственно, по яДНК: *mus* и *cas* — 6 и 18%, а *mus × cas* — 76%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые предпринята попытка сравнить результаты по структуре популяций *M. musculus* в Приморском крае по нескольким независимым маркерам: я-, мтДНК и хромосомы. В предлагаемом исследовании мы сопоставили данные по этим характеристикам для каждого животного и уточнили структуру популяций в гибридной зоне Приморья. Как видно из представленных результатов, в большинстве случаев эти сравнения показали противоречивые картины генетической структуры популяций. Поскольку каждый организм несет уникальную совокупность хромосомных, ядерных и митохондриальных признаков, то исследуя перечисленные характеристики по отдельности, мы теряем информацию о других уровнях наследственности, которая в гибридных животных часто является разной. Например, подвиды *castaneus* и *domesticus*, хорошо отличающиеся по маркерам ядерной и митохондриальной ДНК, не различаются кариологически. Мы предполагаем, что маркеры, кодируемые я- и мтДНК, а также хромосомные признаки являются несвязанными, поскольку довольно большое количество случаев выявило разные результаты в гибридах (4 особи из 54). Поэтому невозможно использовать только один признак, чтобы установить

структурную популяцию; для полной картины необходимо анализировать все доступные маркеры.

В начале наших исследований молекулярно-генетические признаки подвидов домовой мыши были слабо изучены и малоизвестны. Выбор метода RAPD-анализа давал возможность быстро и с наименьшими материальными затратами исследовать полные геномы животных и обнаружить, хотя и анонимные, таксономические различия в масштабах всего генома [4]. Известно, что RAPD обладает рядом недостатков [8, 24]. Поэтому мы предприняли попытку усовершенствовать данный метод на примере наших образцов путем поиска генетических маркеров, которые были специфичны для каждого подвида. Было проведено секвенирование наиболее значимых ПЦР продуктов, что позволило нам вывести некоторые RAPD-признаки из-под статуса анонимности. Изучая выявленные маркеры, мы увидели, что причины отсутствия маркерных фрагментов у других подвидов связаны с мутациями в месте посадки одного или обоих праймеров. Скорее всего, эти изменения и привели к отличиям в количестве ПЦР-продуктов в полученных RAPD-картинах. Например, для фрагмента OPD-06₇₂₈ у *domesticus*, при сравнении с последовательностью из Генбанка, на ведущей цепи в месте посадки праймера обнаружена трансверсия (A-T) в первой позиции посадки праймера, а обратный мотив имел полное сходство.

В литературе имеются немногочисленные данные по идентификации RAPD-фрагментов, которые представлены как уникальными генами, так и средними и высокими повторами [8]. Так, Абдель Гхани и Заки проанализировали пять полиморфных и мономорфных RAPD-локусов у четырех видов египетского хлопка *Gossypium barbadense* [25]. Оказалось, что мономорфные RAPD-последовательности были гомологичные и относились к структурным генам растений. Авторы сделали вывод, что эти сравниваемые ДНК-последовательности идентичны друг другу, а сходство по размеру является хорошей предпосылкой их гомологии. С другой стороны, полиморфные RAPD-фрагменты имели гомологию только для средних и высокоповторяющихся локусов. В нашем анализе на основании исследования сходных по размеру последовательностей получен результат, который подвергает сомнению утверждение о гомологии первичных последовательностей, основанное только на длине фрагментов.

Кроме ядерных и митохондриальных характеристик мы привлекли кариологические данные, поскольку они по ряду особенностей близки к ядерным признакам. Хромосомные перестройки, как и молекулярные, имеют дискретность и одно-

значную связь между генотипом и фенотипом. Помимо этого они характеризуются универсальностью (до 98% всех сестринских видов различаются по хромосомам) [9, 26]. Во многих случаях хромосомные и молекулярные признаки хорошо сочетаются, позволяя решать сложные таксономические проблемы в ситуациях, в которых возможности молекулярных данных были ограничены [27]. Одним из примеров такого применения может быть анализ клопов сем. Nabidae (отр. Нетероптера), в котором использовалось секвенирование фрагмента гена 18S rRNA совместно с цитогенетическими данными [28]. Цитогенетический и молекулярный подходы имеют большее разрешение по сравнению с традиционными методами систематики и филогенетики, основанными на изучении морфологии, и важны при совместном использовании, так как дополняют и корректируют друг друга [27].

Однако в отличие от приведенного выше примера в настоящем исследовании необходимо отметить отсутствие корреляции между кариологическими и молекулярно-генетическими маркерами для подвида *gansuensis*, что в свою очередь отражается на описании таксономической структуры популяций. Дифференциация подвидов *musculus* и *gansuensis* по молекулярно-генетическим данным не существенна ($D_N = 0.08$), однако они хорошо отличаются по морфологическим признакам и кариологическим маркерам. Мы не обнаружили “хороших” молекулярных маркерных признаков для подвида *gansuensis* [4], что может быть связано с гибридизацией и присутствием большей доли признаков от других подвидов домовой мыши у исследованных нами животных. Однако это не сказывается на присутствии маркерных хромосом *gansuensis*, что указывает на сложную схему взаимодействия молекулярного и хромосомного уровней наследственности.

Имеется много работ, в которых отмечаются противоречия в интерпретации результатов исследований структуры популяций по разным типам маркеров. Так, Козловский с соавт. [29], изучая домовых мышей Туркменистана, обнаружили явное несоответствие результатов цитогенетического и биохимического анализа и высказали предположение о перекрывании межпопуляционной и подвидовой изменчивости при добавлении новых географически удаленных точек. Лавренченко с соавторами также показали существенные различия в распространении ядерных и хромосомных маркеров в исследовании гибридной зоны двух 46-хромосомных форм полевки обыкновенной, где наблюдается отсутствие исходных родительских форм и дефицит гибридов первого поколения [30]. Некоторые маркерные

локусы по мере накопления новых данных могут со временем утрачивать свой статус, поскольку проявляют себя как диагностические в локальных зонах или в местах перекрывания ареалов [31]. Основной вывод данной работы состоит в том, что отличия в таксон-специфичных RAPD-фрагментах связаны с изменениями в структуре важных функциональных генов (см. рис. 2) и это можно с большей уверенностью отнести к значимым генетическим маркерам, поскольку они не являются результатом контаминации проб чужеродной ДНК.

Таким образом, выявленное в настоящем исследовании несоответствие в распространении разных типов таксон-специфичных маркеров у домовых мышей Приморья обусловлено сложными процессами гибридизации с участием нескольких форм. Наше исследование расширило и уточнило сложную генетическую структуру гибридных популяций домовой мыши Приморского края и показало целесообразность комплексного подхода для разрешения сложных вопросов в изучении явления гибридизации.

Авторы благодарны академику Я. Жану за предоставленную возможность провести часть экспериментальной работы на базе Куньминского зоологического института и Юннаньского университета, П. Луану за участие и помочь в работе, а также Л.В. Фрисман, Л.В. Якименко, В.П. Кораблеву, М.В. Павленко и Г.Н. Челоминой за помочь в отлове домовых мышей, Х. Сузуки, К. Аплину и К. Тсучие за предоставление генетического материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ-ГФЕН 06-04-39015 и Программы ОБН РАН “Биологические ресурсы России: оценка состояния и фундаментальные основы мониторинга” гранта ДВО РАН 09-І-ОБН-03.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferris S.D., Sage R.D., Huang C.M. et al. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 2290–2294.
2. Powell J.R. Interspecific cytoplasmic gene flow in the absence of nuclear gene flow: evidence from *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 492–495.
3. Spolsky C., Uzzell T. Natural interspecific transfer of mitochondrial DNA in amphibians // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 5802–5805.
4. Спиридонова Л.Н., Коробицына К.В., Якименко Л.В., Богданов А.С. Генетическая дифференциация подвидов домовой мыши *Mus musculus* и их таксономические взаимоотношения: данные RAPD-PCR анализа // Генетика. 2008. Т. 44. №. 6. С. 841–849.

5. Спиритонова Л.Н., Челомина Г.Н., Мориваки К. и др. Генетическое и таксономическое разнообразие домовых мышей в азиатской части бывшего СССР // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1378–1388.
6. Seifert B., Goropashnaya A.V. Ideal phenotypes and mismatching haplotypes – errors of mtDNA treeing in ants (Hymenoptera: Formicidae) detected by standardized morphometry // Org. Diver. Evol. 2004. V. 32. № 4. P. 295–305.
7. Спиритонова Л.Н., Челомина Г.Н., Тсуда К. и др. Генетические свидетельства обширной интрагрегации генов короткохвостого суслика в зоне гибридизации *Spermophilus major* и *S. erythrogenys*: данные секвенирования гена цитохрома *b* мтДНК // Генетика. 2006. Т. 42. № 7. С. 976–984.
8. Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. 2002. Т. 38. № 8. С. 1013–1033.
9. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журн. общ. биол. 2004. Т. 65. № 4. С. 278–305.
10. Dean R., Arnold J. Cytonuclear disequilibria in hybrid zones using RAPD-markers // Evolution. 1996. V. 50. № 4. P. 1702–1705.
11. Harrison R.G., Rand D.M., Wheeler W.C. Mitochondrial DNA variation in field crickets across a narrow hybrid zone // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 2. P. 144–158.
12. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестн. ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
13. Холодова М.В. Сравнительная филогеография: молекулярные методы, экологическое осмысление // Мол. биол. 2009. Т. 43. № 5. С. 910–917.
14. Minezawa M., Moriwaki K., Kondo K. The third allele of supernatant isocitrate dehydrogenase of house mouse, Id-I^c originates from Asian continent // Jap. J. Genet. 1980. V. 55. № 5. P. 389–396.
15. Межжерин С.В., Котенкова Е.В. Генетическое маркирование подвидов домовых мышей фауны СССР // Докл. АН СССР. 1989. Т. 304. № 5. С. 1271–1275.
16. Фрисман Л.В., Коробицына К.В., Якименко Л.В., Воронцов Н.Н. Какие биохимические группы домовых мышей обитают на территории СССР? // Эволюционные генетические исследования млекопитающих: Тез. докл. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. Т. 1. С. 35–54.
17. Коробицына К.В., Якименко Л.В., Фрисман Л.В. К вопросу о систематике домовых мышей фауны СССР (цитогенетические данные) // Эволюционные генетические исследования млекопитающих: Тез. докл. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. Т. 1. С. 55–78.
18. Якименко Л.В., Коробицына К.В., Фрисман Л.В. и др. Генетические исследования домовых мышей в гибридной зоне Приморского края // Генетика. 2000. № 36. Т. 1. С. 77–86.
19. Yonekawa H., Tsuda K., Yakimenko L.V. et al. Genetic diversity, geographic distribution and evolutionary relationships of *Mus musculus* subspecies based on polymorphisms of mitochondrial DNA // Проблемы эволюции. Владивосток: Дальнаука, 2003. Т. 5. С. 90–108.
20. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
21. Prager E.M., Sage R.D., Gyllensten U. et al. Mitochondrial DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East Holstein // Biol. J. Linn. Soc. 1993. V. 50. P. 85–122.
22. Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A New DNA Sequence Assembly Program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.
23. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. and Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599.
24. Hadrys H., Balick M., Schierwater B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology // Mol. Ecol. 1992. V. 1. P. 55–63.
25. Abdel Ghany A.A., Zaki E.A. DNA Sequences of RAPD Fragments in the Egyptian cotton *Gossypium barbadense* // African J. Biotechnol. 2003. V. 2. № 5. P. 129–132.
26. White M.J.D. Modes of speciation. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1978. 455 p.
27. Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г. Молекулярно-генетические и цитогенетические подходы к проблемам видовой диагностики, систематики и филогенетики // Журн. общ. биол. 2009. Т. 70. № 5. С. 415–437.
28. Nokkala C., Kuznetsova V., Grozeva S., Nokkala S. Direction of karyotype evolution in the bug family Nabidae (Heteroptera): New evidence from 18S rDNA analysis // Eur. J. Entomol. 2007. V. 104. P. 661–665.
29. Козловский А.И., Булатова Н.Ш., Орлов В.Н. Недекватность интерпретации результатов цитогенетического и биохимического анализа домовых мышей Туркменистана // Докл. РАН. 1997. Т. 353. № 3. С. 418–422.
30. Лавренченко Л.А., Потапов С.Г., Булатова Н.Ш., Голенищев Ф.Н. Исследование гибридизации двух 46-хромосомных форм обыкновенной полевки (*Microtus arvalis*) с использованием цитогенетических, митохондриальных и ядерных маркеров // V съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. М., 2009. Ч. II. С. 288.
31. Рафиев А.Н. Белковый полиморфизм домовых мышей (род *Mus*) на территории СССР: Автореф. ... канд. дис. М.: ИЭМЭЖ АН СССР. 1990. 19 с.

Discordance in the Distribution of Markers of Different Inheritance Systems (nDNA, mtDNA, and Chromosomes) in the Superspecies Complex *Mus musculus* as a Result of Extensive Hybridization in Primorye

L. N. Spiridonova, K. V. Kiselev, and K. V. Korobitsyna

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

The genetic structure of eight *Mus musculus* L. populations in Primorskii krai was studied with the use of taxon-specific markers of different inheritance systems: nDNA (RAPD), mtDNA (D-loop), and chromosomes. The results obtained demonstrate that although the compared nuclear marker characteristics (nDNA and chromosomes) have the same basis they are not linked with each other and, moreover, are often mutually inconsistent. Discordance in the inheritance of the marker characteristics in most of the animals studied is a result of extensive hybridization involving two to four house mouse subspecies. To identify taxon-specific nuclear markers revealed by RAPD, they were cloned and sequenced, and their localization on chromosomes was determined. It was found that some fragments similar in size consist of two different comigrating sequences that are localized on different chromosomes and belong to different subspecies. All sequenced anonymous markers are localized in protein-coding genes. The functions of genes containing the marker sequences have been established. Differences in the taxon-specific RAPD fragments are associated with changes in the structure of important functional genes, and this can be considered as a significant genetic marker.