

УДК 547.963.32:575.852.113:599.36

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНТЕР-SINE-ПЦР В ИЗУЧЕНИИ ФИЛОГЕНЕЗА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2002 г. А. А. Банникова¹, В. А. Матвеев¹, Д. А. Крамеров²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра зоологии позвоночных, Москва 119899; e-mail: grechko@genome.eimb.relarn.ru

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991

Поступила в редакцию 31.10.2001 г.

Изложены результаты применения разновидности фингерпринтинга – интер-SINE-ПЦР – в исследовании филогенетических связей и таксономических отношений млекопитающих из отрядов рукокрылые (Chiroptera, Vespertilionidae) и насекомоядные (Lipotyphla, Erinaceidae). Метод интер-SINE-ПЦР основывается на амплификации фрагментов, расположенных между копиями SINEs – коротких ретропозонов, которые находятся на расстоянии 100–1000 пн друг от друга. Используются праймеры, комплементарные консенсусным последовательностям двух коротких ретропозонов: элемент MIR, характерный для всех млекопитающих и некоторых других позвоночных (в случае летучих мышей и ежовых), и элемент ERI-1, недавно выделенный из генома даурского ежа (в случае ежовых). Данные поддерживают современные представления о филогенетических связях ежей из родов *Erinaceus*, *Hemiechinus* и *Paraechinus*, но не рода *Atelerix*. При филогенетической обработке данных по рукокрылым статистически достоверная топология получена только на низких таксономических уровнях, в то время как на уровне таксонов родового и надродового ранга топология оказалась неразрешенной, веероподобной. Обсуждаются преимущества и границы применения интер-SINE-ПЦР.

В современной филогенетике и таксономии внутриотрядного уровня заметно возросла роль молекулярных маркеров, основанных на использовании полимеразной цепной реакции. Это, например, RAPD, выявляющий случайной амплифицированные полиморфные фрагменты ДНК с помощью единичного случайного праймера [1]; метод SSR–ПЦР, позволяющий амплифицировать участки ДНК, расположенные между микросателлитами [2]; AFLP, заключающийся в избирательной амплификации рестриктных фрагментов геномной ДНК и объединяющий возможности ПДРФ и ПЦР [3]. Поиск универсальных маркеров, пригодных как для диагностических, так и для филогенетических целей на разных таксономических уровнях, продолжается.

В предлагаемой работе мы излагаем результаты использования нами еще одной разновидности фингерпринтинга – интер-SINE-ПЦР – в исследовании таксономических отношений млекопитающих. SINEs (short interspersed elements), или короткие ретропозоны – это повторяющиеся последовательности ДНК длиной от 80 до 400 пн, десятки и даже сотни тысяч копий которых рассеяны по геному [4–6]. SINEs транскрибируются РНК-полимеразой III, и образуемые низкомолекулярные РНК, подвергаясь обратной транскрипции, могут приводить к возникновению новых копий SINEs. Подавляющее большинство семейств SINEs ведут свое происхождение от молекул

тРНК, что было установлено по наличию сходства нуклеотидных последовательностей тРНК и головной части SINEs. Хвостовая часть SINEs обычно образована А-богатой последовательностью, тогда как центральная часть совершенно различна у SINEs разных семейств. Наличие или отсутствие в геноме семейства SINEs представляет собой совершенную синапоморфию, так как однажды возникнув, семейство SINEs сохраняется во всех позднее отделившихся ветвях данного ствола эволюционного древа [7, 8]. Не менее совершенный синапоморфный признак – это наличие/отсутствие отдельных копий SINEs в определенных локусах генома. Эти признаки с успехом использовались в изучении филогенеза млекопитающих и рыб [9, 10]. Однако такой подход методически очень трудоемок и дорог.

Значительно более прост и дешев другой, также основанный на использовании SINEs, подход к изучению филогений. Это – метод интер-SINE-ПЦР, в котором происходит амплификация фрагментов, расположенных между копиями SINEs, находящимися на сравнительно небольшом (100–1000 пн) расстоянии друг от друга (рис. 1). Впервые полиморфизм длины участков ДНК, фланкируемых короткими диспергированными повторами, был исследован при изучении *Alu*-полиморфизма в геноме человека (так называемая *Alu*-ПЦР, или IRS–ПЦР [11]). Позже этим способом был исследован полиморфизм других коротких

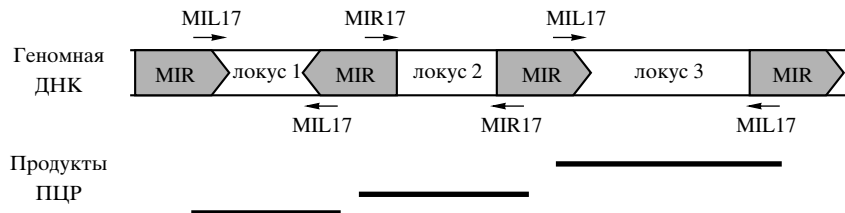


Рис. 1. Схема SINE-ПЦР. Показаны четыре копии MIR-элемента, три из которых ориентированы в одну сторону, а одна – в другую. Тонкими стрелками обозначены праймеры MIL17 и MIR17, комплементарные разным цепям ДНК. Каждый из праймеров в отдельности обеспечивает амплификацию участков, заключенных между копиями MIR-элемента, ориентированными “хвост” к “хвосту” (локус 1) или “голова” к “голове” (локус 2). Одновременное присутствие в реакционной смеси обоих праймеров обуславливает амплификацию фрагмента, который фланкирован одинаково ориентированными копиями MIR – “хвост” к “голове” (локус 3).

диспергированных повторов в отряде млекопитающих Artiodactyla [12].

Наше внимание привлекло семейство SINEs, называемое MIR (mammalian interspersed repeat), которое представлено 10^5 копиями в геномах, видимо, всех млекопитающих [13–15]. MIR-элементы имеют ряд существенных особенностей. Они представляют собой одно из самых древних из известных семейств SINEs, о чем свидетельствует широкий круг распространения и очень большая (вплоть до 50%) дивергенция его копий. Последний факт также указывает на то, что в отличие от других известных SINEs MIR уже довольно давно перестал воспроизводиться. Видимо, вследствие древности полноразмерные копии MIR (длиной 260 пн) встречаются редко. Как правило, копии лишены одного или обоих концов и значительное их большинство, по не вполне понятным причинам, представлено только центральным участком (CORE-последовательность) длиной около 70 пн. Различия в спектрах продуктов интер-SINE-ПЦР связаны как с мутациями в самих копиях этих повторов, так и с возникновением делеций и вставок в участках ДНК, расположенных между ними.

К настоящему времени интер-SINE-ПЦР был применен только для изучения филогении парнокопытных [16]. Объект наших исследований – млекопитающие из двух отрядов: насекомоядные (Lipotyphla) и рукокрылые (Chiroptera). Помимо MIR-элементов с аналогичной целью мы использовали короткий ретропозон ER11 длиной 158 пн, специфичный лишь для семейства Erinaceidae, который недавно выделен из генома даурского ежа *Hemiechinus dauricus* [17]. Отметим, что ранее такие SINEs, характеризующиеся узким кругом распространения и относительно невысокой дивергенцией копий, никогда не использовались для филогенетических исследований методом интер-SINE-ПЦР.

По последним данным молекулярной макросистематики [18, 19], истинные насекомоядные (Eulipotyphla) и летучие мыши (Microchiroptera) составляют монофилетическую группу, хотя направления их радиации очень различны. Древние

насекомоядные представляли собой весьма генерализованную группу, что позволило им стать исходными для большинства позднейших плацентарных. Рукокрылые с момента своего возникновения и до сих пор относятся к наиболее специализированным млекопитающим, но в то же время часть из них – летучие мыши – сохранили определенные морфологические черты, сближающие их с насекомоядными [20]. Самое древнее семейство среди насекомоядных – ежовые (Erinaceidae). До сих пор нет согласованного мнения о числе составляющих его родов и видов. Самое крупное семейство рукокрылых – гладконосые летучие мыши (Vespertilionidae) – также является одним из самых трудных в систематическом отношении. Все это определяет смысл сравнительного изучения обеих групп.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Характеристика образцов. Из насекомоядных использованы 39 ежей (подсемейство Erinaceinae) и 2 гимнуры (подсемейство Hylomyiinae); из рукокрылых – 40 летучих мышей из семейства гладконосых (Vespertilionidae), 2 представителя разных видов семейства подковоносов (Rhinolophidae) и 2 бульдоговые летучие мыши (Molossidae). Характеристика материала приведена в табл. 1.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из фиксированных этанолом тканей (мышцы, семенники, почки и печень) по методу фенол-хлороформной депротеинизации после обработки гомогената тканей проназой [21].

Условия интер-SINE-ПЦР. Интер-MIR-ПЦР (далее MIR-ПЦР) проводили с использованием одного или двух праймеров, комплементарных наиболее консервативному участку центральной CORE-последовательности элемента MIR [14]: MIR17 – 5'-AGTGACTTGCTCAAGGT-3', MIL17 – 5'-GCCTCAGTTTCCTCATC-3' (рис. 1). Праймеры (по 100 пмоль) метили [γ^{32} P]-АТФ (1 МБк) с помощью полинуклеотидкиназы [22]. ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ

Таблица 1. Характеристика материала исследования

Номер опыта	Вид	Число, экз.	Локалитеты
Lipothyphla			
1–14	<i>Erinaceus roumanicus</i>	14	Калужская область; Рязанская обл. (Солотча); Московская обл. (Николина Гора), Брянская обл. (д. Каталино и пос. Вышков); Ставропольский край; Кабардино-Балкария (Нальчик); Дагестан
15–21	<i>E. concolor</i>	7	Азербайджан (Ленкорань); Абхазия (Гудауты); Турция*; Израиль (Хайфа)*
22–27	<i>E. europaeus</i>	6	Московская обл. (Николина Гора и Красногорск); Тверская обл. (д. Колчеватики, д. Крутицы); Великобритания (Норидж)*
28	<i>E. amurensis</i>	1	Приморский край (Уссурийский р-н)
29	<i>Atelerix frontalis</i>	1	Южная Африка**
30	<i>A. algirus</i>	1	Гран-Канарио (Лас Пальмас)
31	<i>A. albiventris</i>	1	Сенегал, Дакар*
32–33	<i>Paraechinus aethiopicus</i>	2	Саудовская Аравия (Тумамах)*, Саудовская Аравия**
34	<i>P. hypomelas</i>	1	Туркменистан
35	<i>Hemiechinus dauuricus</i>	1	Бурятия
36–37	<i>H. auritus</i>	4	Туркменистан (Кара-Кала и Бабараб); Ставропольский край (с. Степановское)
40	<i>Neotetracus sinensis</i>	1	Вьетнам***
41	<i>Hylomys suillus</i>	1	Таиланд (Chaiyaphum)**
Chiroptera			
1–3	<i>Pipistrellus nathusii</i>	3	Московская обл., Белоруссия
4	<i>P. pipistrellus</i>	1	Краснодарский край, Туапсинский р-н
5–6	<i>P. kuhli</i>	2	Волгоградская обл., Михайловский р-н
7	<i>P. abramus</i>	1	Вьетнам, Ханой
8	<i>Hypsugo pulveratus</i>	1	Вьетнам (Бинь-Куань)
9	<i>H. savii</i>	1	Приморский край
10	<i>Nyctalus noctula</i>	1	Волгоградская обл., Михайловский р-н
11–12	<i>N. leisleri</i>	2	Волгоградская обл., Михайловский р-н
13	<i>Vespertilio sinensis</i>	1	Читинская обл., Даурский зап.
14	<i>V. murinus</i>	1	Получен из неволи
15	<i>Eptesicus serotinus</i>	1	Кабардино-Балкария (Нальчик)
16–17	<i>Scotomanes ornatus</i>	2	Непал (Аннапурна), Вьетнам
18	<i>Hesperoptenus blanfordi</i>	1	Камбоджа (Пном-Бокор)
19	<i>Miniopterus schreibersii</i>	1	Непал (Аннапурна)
20–21	<i>M. sp.</i>	2	Камбоджа (Пном-Бокор)
22	<i>M. inflatus</i>	1	Эфиопия (пров. Бале)
23	<i>Plecotus auritus</i>	1	Волгоградская обл., Михайловский р-н
24	<i>P. balensis</i>	1	Эфиопия (пров. Бале)
25	<i>Barbastella leucomelas</i>	1	Таджикистан (Ходжанд)
26	<i>Myotis montivagus</i>	1	Вьетнам
27	<i>M. annamiticus</i>	1	Вьетнам (пров. Бинь-Куань)
28–29	<i>M. daubentoni</i>	2	Московская обл. (Тучково)
30–32	<i>M. muricella</i>	3	Камбоджа (Пномпень и Кэмпот); Непал
33	<i>M. csorbai</i>	1	Непал (Аннапурна)
34	<i>M. ikonnikovi</i>	1	Приморский край (Уссурийский р-н)
35	<i>M. nattereri</i>	1	Московская обл. (Тучково)
36	<i>M. blythi</i>	1	Грузия
37	<i>M. dasycneme</i>	1	Московская обл. (Тучково)
38	<i>M. brandti</i>	1	Московская обл. (Тучково)
39	<i>M. mystacinus</i>	1	Краснодарский край, Туапсинский р-н
40	<i>Harpiocephalus mordax</i>	1	Камбоджа (Пном-Бокор)
41	<i>R. ferrumequinum</i>	1	Краснодарский край, Адлерский р-н
42	<i>Rhinolophus affinis</i>	1	Эфиопия (пров. Бале)
43–44	<i>Chaerephon plicata</i>	2	Камбоджа (Пном-Бокор)

* Материал для выделения ДНК любезно предоставлен д-ром Ф. Сантуцци (Университет Восточной Англии, Норидж).

** Материал для выделения ДНК любезно предоставлен д-ром Ф. Катзэфлисом (Университет в Монпелье, Франция).

*** Материал собран с. н. с. ИПЭЭ РАН Г.В. Кузнецовым.

буфера трис-НСI pH 8.3, 50 мМ КСI, 2.5 мМ MgCl₂, 0.001% желатин, 0.2 мМ dNTP, 4 пмоль каждого праймера, 1 ед. *Taq*-полимеразы (“Sileks”) и 25 нг ДНК. Условия MIR-специфичной реакции амплификации соответствовали ранее описанным [14]: денатурация – 94°C, 30 с; отжиг – 56°C, 45 с; синтез – 72°C, 2 мин. Число циклов – 27. Предварительная денатурация продолжалась 3 мин при 94°C; конечный синтез – 5 мин при 72°C.

В ERI-ПЦР использовали праймер 5'-ССАС-СТССС(G/A)GGACCAC-3', комплементарный переднему концу элемента ERI1 [17], который затравлял синтез ДНК, направленный вперед от SINE. Праймер метили, как описано выше. Стабильно воспроизводимый набор полос был достигнут в опытах с ERI1 при повышении температуры отжига на 5°C по сравнению с расчетной. В результате реакцию амплификации осуществляли при следующих температурных условиях: денатурация – 94°C, 30 с; отжиг – 65°C, 45 с; синтез – 72°C, 2 мин. Число циклов – 27. Предварительная денатурация продолжалась 3 мин при 94°C; конечный синтез – 5 мин при 72°C.

Все опыты выполнены на приборе MJ Research, Inc. Продукты ПЦР денатурировали и разделяли электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле, содержащем трис-боратный буфер и 8 М мочевины, аналогично тому, как это делают при секвенировании ДНК. Длина геля – 50 см, толщина – 0.4 мм. Электрофорез продолжался 7 ч при постоянной мощности тока 75 Вт. Радиоавтографию проводили, экспонируя высушенный гель с рентгеновской пленкой RETINA в течение 16–18 ч.

Филогенетический анализ. Фингерпринты, полученные при MIR- и ERI-ПЦР, были преобразованы в бинарную матрицу (1 – присутствие полосы, 0 – отсутствие), которую анализировали по методу максимальной экономии Вагнера (maximum parsimony – MP) в пакете PAUP, 4.0b4a [23] и методу ближайшего связывания (neighbor-joining – NJ) в программе TREECONW [24]. Генетические расстояния (D_L) рассчитаны по Линку с соавт. [25] и связаны с коэффициентом сходства Жаккарда (J) соотношением $D_L = 1 - J$. В бутстрэп-анализе осуществляли 1000 реплик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика праймеров и спектров интер-SINE-ПЦР

Получены высокоинформативные спектры продуктов ПЦР ДНК всех видов ежовых и летучих мышей, которые содержали большое количество четко выраженных полос. В качестве образца на рис. 2 приведен фрагмент геля после электрофоретического фракционирования продуктов MIR-ПЦР ДНК летучих мышей. Верхняя часть этого

геля (примерно 1/8 его часть), содержащая фрагменты размером более 1000 нп, не анализировалась и на рисунке не представлена.

MIR-повторы присутствуют в геноме в обеих ориентациях. Это дает возможность использовать при постановке MIR-специфичной полимеразной реакции как один, так и два противоположно направленных праймера (рис. 1). При использовании одного праймера амплификации подвергаются только противоположно ориентированные (“голова” к “голове” или “хвост” к “хвосту”) копии MIR. При использовании праймера MIR17, определяющего амплификацию локусов, фланкируемых направленными “хвост” к “хвосту” MIR-повторами, в каждом образце ДНК летучих мышей было выявлено 100–200 фрагментов длиной 100–1000 нуклеотидов. В опытах с ежами с этим праймером амплифицировалось относительно небольшое число фрагментов (не более 40 полос для одного образца). Для увеличения числа фрагментов в ПЦР ДНК ежей был использован еще один MIR-специфичный праймер – MIR17, который определяет амплификацию локусов, фланкируемых направленными “голова” к “голове” MIR-повторами. Одновременное использование этих двух разнонаправленных праймеров позволило увеличить количество фрагментов и получить фрагменты меньшего размера (90–1500 нуклеотидов). Фингерпринты ежей в этом случае содержали 60–70 полос для каждого образца. Это, очевидно, объясняется тем, что при использовании двух праймеров амплификация происходит как на противоположно, так и на одинаково ориентированных (“голова” к “хвосту”) копиях (рис. 1).

Для ежей анализировали фингерпринты, полученные в MIR-ПЦР с двумя праймерами. Число принятых к рассмотрению признаков для 40 образцов составило 298. Число принятых к рассмотрению бинарных признаков для 44 летучих мышей составило 757. Получив столь насыщенный спектр, мы посчитали нецелесообразным увеличивать его за счет введения в опыт второго праймера.

В ERI-специфичной ПЦР, как выяснилось, последовательность праймера к ретропозону ERI1 должна быть комплементарна “головной” части повтора. В этом случае амплификация происходит на противоположно ориентированных, “голова” к “голове”, копиях. При попытке использовать праймеры, комплементарные центральному участку ретропозона, амплификация копий, ориентированных “хвост” к “хвосту”, происходит менее удачно. В этом случае спектры амплификации представляли собой картину из многих, но размытых нечетких полос. Мы предполагаем, что это является результатом образования “шпилечных” структур за счет слипания длинных ком-

M 1 2 3 4 5 6 M 7 8 9 10 11M 12 13 14 15 16 17 18M 19 20 21 22 23 24 25M 26 27 28 29 30 31 32M 33 34 35 36 37 38M 39 40 41 42 43 44M

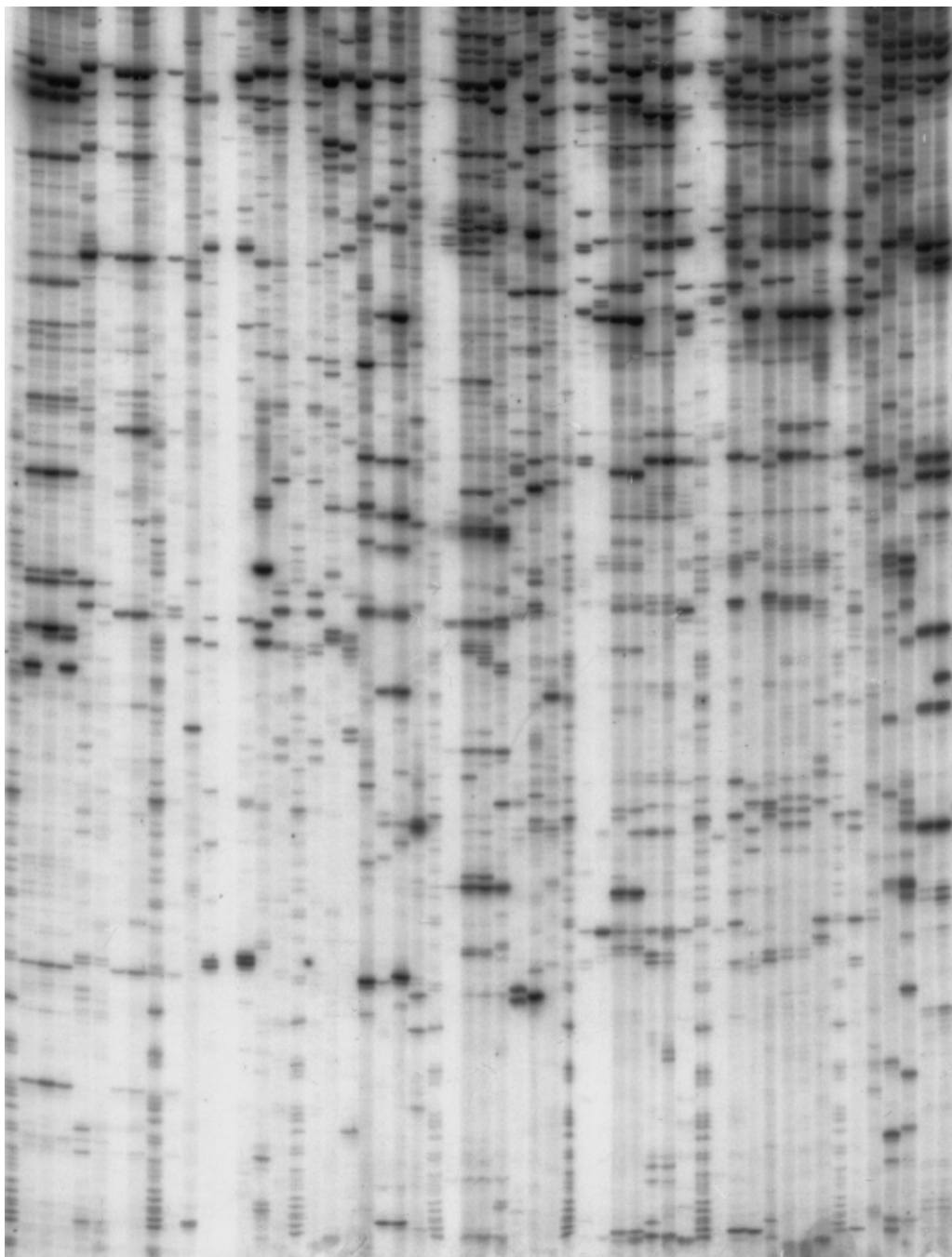


Рис. 2. Электрофоретическое фракционирование продуктов MIR-ПЦР геномных ДНК 31 вида летучих мышей. Нумерация дорожек соответствует порядку перечисления видов в табл. 1. М – маркер, представляющий собой продукт секвенционной реакции (для одного из нуклеотидов) плазмиды pGEM7z. Маркер нанесен на каждую 7-ю или 8-ю дорожку.

плементарных участков, имеющих в данном случае на концах ПЦР-продуктов. Кроме того, в этом варианте амплифицируется не только фланкируемая ретропозомом область, но также длинные участки самого повтора, поэтому в продуктах ПЦР содержится много слишком длинных для качественного анализа фрагментов. В ERI-ПЦР с од-

ним праймером у ежей образуется около 50, а у гимнур – 18–20 фрагментов длиной от 70 до 700 пн. Число принятых к рассмотрению бинарных признаков для 41 образца – 237. Как и в случае MIR-ПЦР, при анализе фингерпринтов самые длинные фрагменты (более 700 пн) во внимание не принимали.

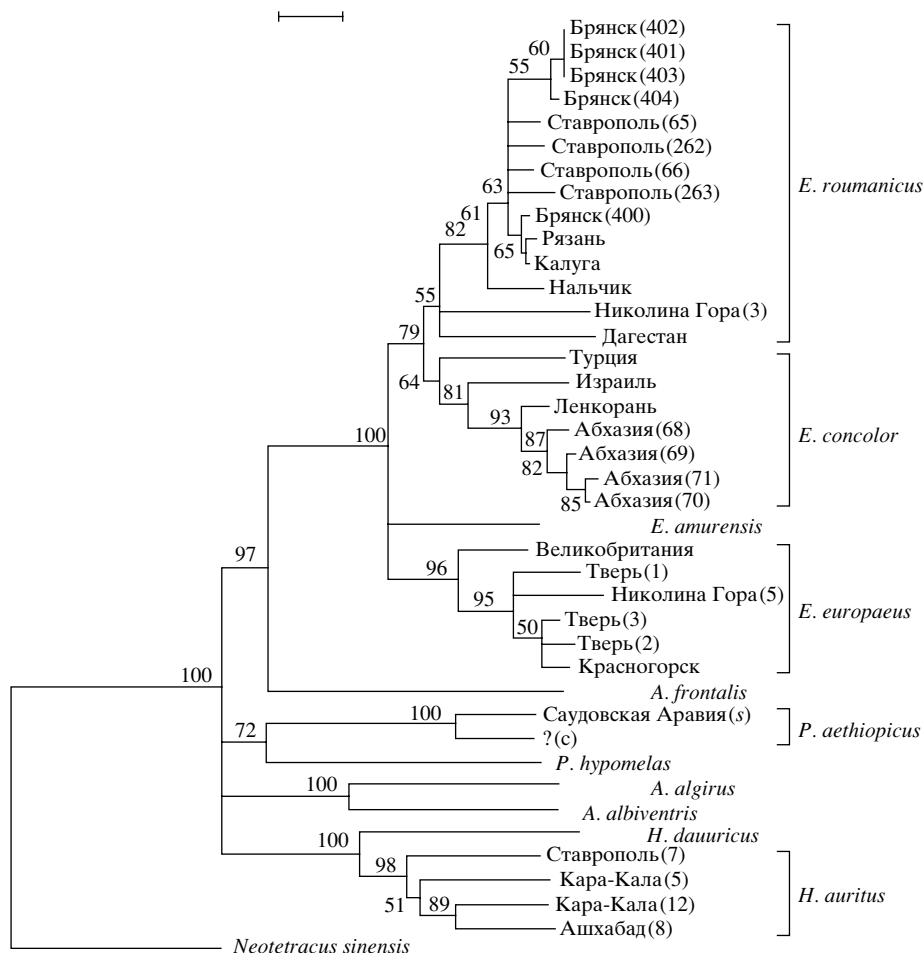


Рис. 3. Дендрограмма филогенетических отношений ежей, построенная методом ближайшего связывания (NJ) по результатам MIR-ПЦР. Числа над ветвями – индексы бутстрэпа (% от 1000 реплик); кластеры, достоверность которых ниже 50%, показаны как неразрешенные и индексы бутстрэпа для них не указаны. Вместе с локалитетами образцов указан их коллекционный шифр (в скобках). Вид *Neotetracus sinensis* использован как внешняя группа.

На рис. 3–5 представлены результаты филогенетической обработки данных методом ближайшего связывания. Поскольку топология NJ- и MP-дендрограмм оказалась идентичной, парсимониальные деревья не приведены.

Индивидуальная изменчивость и географическая изменчивость. Под индивидуальной изменчивостью в данной работе мы понимаем внутривидовую изменчивость на ограниченной территории, например в пределах области или района.

MIR-ПЦР оказалась более чувствительной к индивидуальной изменчивости образцов по сравнению с ERI-ПЦР. Спектры MIR-ПЦР всех образцов характеризовались индивидуальной изменчивостью. Исключение составили только три белогрудых ежа из пос. Вышков Брянской области, которые имели идентичные геномные спектры. Генетическое расстояние (D_L) для брянских образцов составило 0.00–0.09, для ставропольских –

0.02–0.09, для абхазских – 0.02–0.10. Достаточно далекими оказались *E. europaeus* из двух участков Подмосковья (Николина Гора и Красногорск) – 0.13 (рис. 3).

Фингерпринты географически удаленных образцов, как правило, различаются сильнее, чем фингерпринты особей из одного локалитета. Данная изменчивость, видимо, соответствует межпопуляционной. В большинстве случаев показатель D_L между особями одного вида ежевых из удаленных локалитетов изменялся от 0.1 до 0.35. Однако генетическое расстояние между особями прямо не связано с географической близостью. Так, подмосковный белогрудый еж отстоит от географически близких к нему образцов (Калуга, Рязань), а ежи из Ставропольского края, против ожидания, кластеризуются не с образцами из Нальчика и Дагестана, куда относятся регионально, а с ежами из Брянской области. Обыкновенные ежи из Подмосковья и Тверской области

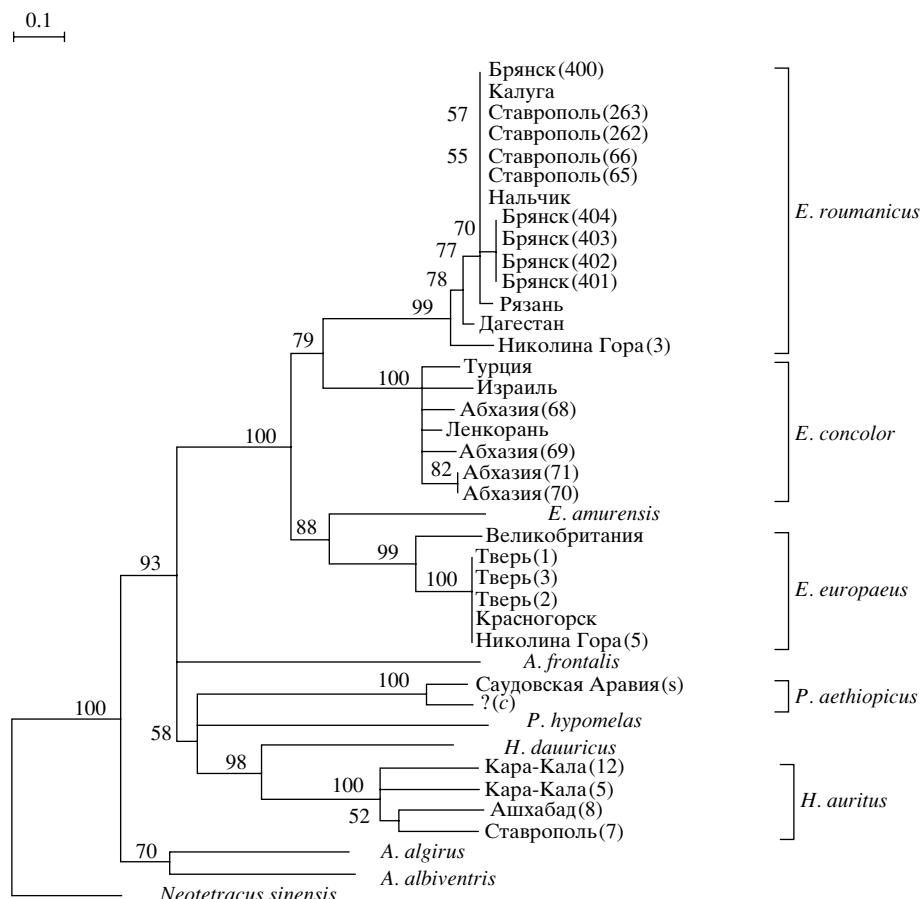


Рис. 4. NJ-дендрограмма филогенетических отношений ежей, построенная методом ближайшего связывания по результатам ERI-ПЦР. Обозначения, как на рис. 3.

очень близки друг другу ($D_L = 0.02-0.08$) и не образуют региональных группировок. Ушастые ежи из Ставрополя, восточного и западного Копет-Дага также не кластеризуются соответственно их географической близости.

Индексы индивидуальных генетических дистанций в случаях летучих мышей варьировали в довольно широких пределах. При этом весьма примечательным фактом является то, что их величина для разных особей лесного нетопыря (*Pipistrellus nathusii*), пойманных в пределах одного местообитания трех разных европейских колоний, не была связана со степенью удаленности этих колоний друг от друга. Если дистанция между нетопырем из Витебской области Белоруссии и другим, из Московской области, составила лишь 0.24, то от третьего, из другого района Московской области, их отделил индекс 0.41. Очень высокий показатель D_L мы получили для двух особей гладконосов-арлекинов *Scotomanes ornatus*, происходящих из весьма удаленных и изолированных друг от друга популяций Непала и Вьетнама, – 0.51, однако он не достигает значе-

ний соответствующих индексов для разных видов одного рода, например, 0.85 – для двух видов ночниц (*Myotis daubentoni* и *M. muricola*). Удивительно высокий показатель индекса дистанции отделил одну особь *M. muricola* из Непала от двух других, происходящих из разных районов Камбоджи, – 0.74. Это значение даже немного превосходит некоторые внутривидовые расстояния для других родов. Вероятно, эти образцы *M. muricola* следует рассматривать как самостоятельные виды. Известно, что *M. muricola* характеризуется значительной вариабельностью по многим морфологическим признакам, а систематика всего рода *Myotis*, по мнению ряда исследователей, всего лишь “предварительная” [26].

В табл. 2 приведены минимальные и максимальные значения D_L для ежей и летучих мышей по результатам MIR-ПЦР. Как видно, индивидуальная и географическая изменчивость в последней группе заметно выше. У тех и других широкий разброс значений D_L характеризует географическую изменчивость. У летучих мышей это расстояние наиболее варьирующее. У ежей в на-

Таблица 2. Генетическая изменчивость ежей и рукокрылых на разных таксономических уровнях по результатам MIR-ПЦР

Таксономический уровень изменчивости	D_L	
	Erinaceidae	Chiroptera
Внутривидовая индивидуальная	0.0–0.13	0.2–0.33
географическая	0.1–0.35 (0.02)	0.3–0.5
Межвидовая	0.35–0.7	0.7–0.86
Межродовая	0.75–0.84	0.9–0.96 (0.81)

Примечание. В скобках приведены случаи отклонения от средних значений.

и более широком диапазоне изменяется межвидовой показатель D_L . Данные по обоим таксонам позволяют заключить, что генетическое расстояние, вычисленное по маркерам интер-SINE-ПЦР,

отражает не только географическую близость особей (или популяций).

Таксономическая изменчивость и филогения

Ежовые. В качестве внешней группы в филогенетическом анализе использованы гимнуры – *Neotetracus sinensis* либо *Hylomys suillus*. Замена одной внешней группы на другую не повлияла принципиально на топологию древ или индексы бутстрэпа (**ИБ**). Древа, выстроенные по результатам MIR- или ERI-ПЦР, отличаются по числу разрешенных кластеров, положению *Atelerix frontalis* и кластера *A. algirus/A. albiventris* (рис. 3 и 4).

На MIR-древе (рис. 3) к группе, соответствующей роду *Erinaceus*, с высоким индексом бутстрэпа (97%) присоединяется *A. frontalis*. В роде *Erinaceus* кластеры, соответствующие видам *E. concolor* и *E. roumanicus*, имеют весьма умеренную бутст-

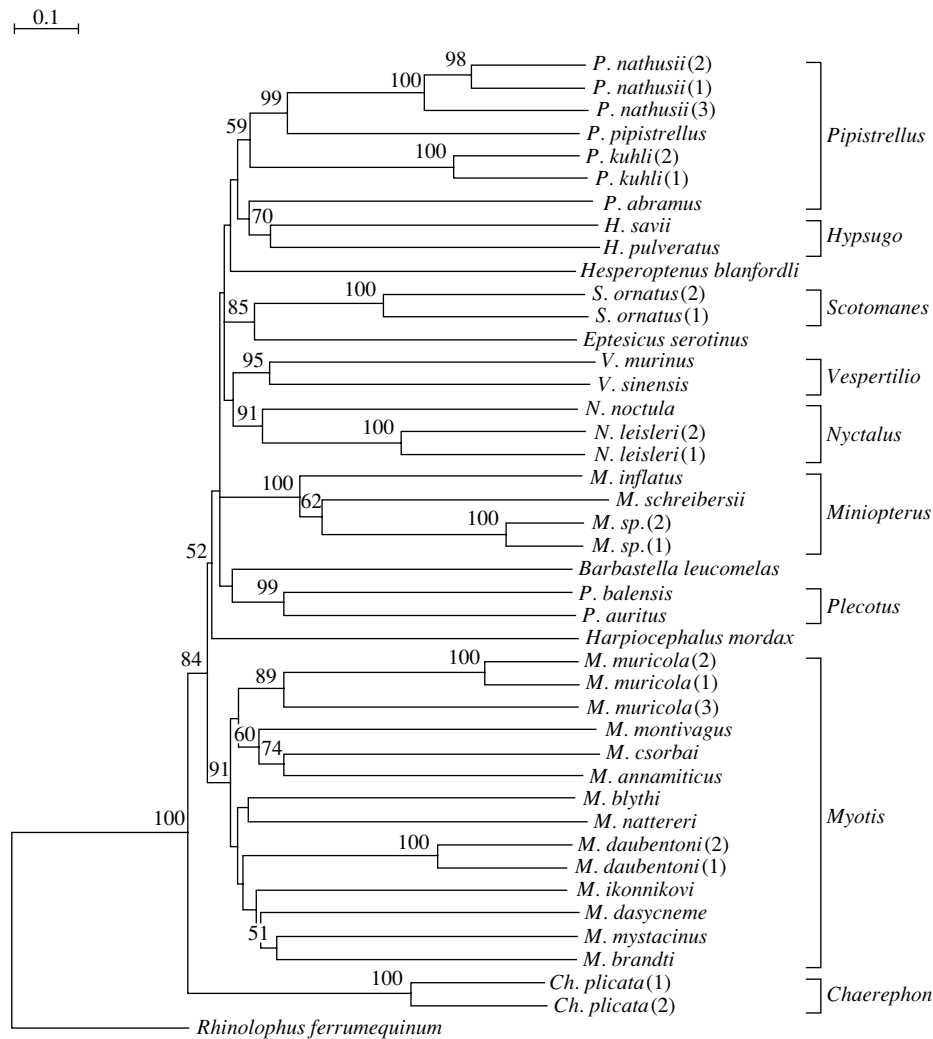


Рис. 5. NJ-дендрограмма филогенетических отношений рукокрылых подсемейства Vespertilionidae по результатам MIR-ПЦР. Вид *Rhinolophus ferrumequinum* использован как внешняя группа. Индексы бутстрэпа для кластеров, достоверность которых ниже 50%, не указаны. В скобках указаны порядковые номера образцов.

рэп-поддержку (55 и 64%), а положение *E. amurensis* относительно этой пары видов и *E. europaeus* неопределенно (ИБ = 42%). Положение кластера *A. algirus/A. albiventris* фактически неразрешенное, поскольку присоединение его к роду *Paraechinus* имеет незначимую бутстрэп-поддержку (34%). То же самое относится к роду *Hemiechinus*: положение этого кластера на ветви дендрограммы, общей с родами *Paraechinus* и *Atelerix*, характеризуется всего 47%-ной поддержкой в бутстрэп-анализе.

На ERI-древо (рис. 4) роды ежей разрешены лучше, что позволяет более уверенно, чем в случае MIR-древа, говорить об их филогенетических связях. В роде *Erinaceus* выделяются четыре кластера (90–100%), соответствующие четырем видам. Положение *A. frontalis* неопределенно (47%). Кластер *A. algirus/A. albiventris* занимает базальное положение по отношению ко всем остальным группам (93%).

Отдельное внимание стоит уделить видам рода *Erinaceus*, поскольку видовой статус форм “concolor” и “roumanicus” – предмет дискуссий и признается далеко не всеми систематиками [27]. Наши результаты подтверждают предположение о глубокой дивергенции белогрудых ежей из Восточной Европы (форма “roumanicus”), с одной стороны, и Малой Азии и Ближнего Востока (форма “concolor”) – с другой [28, 29]. Видимо, ранг этих форм может быть приравнен к видовому.

Таксономическое содержание полученных результатов заключается в следующем: 1) род *Erinaceus* включает 4 вида, поскольку подвиды *concolor* и *roumanicus* заслуживают статуса самостоятельных видов; 2) даурский еж не заслуживает статуса самостоятельного рода, относится к роду *Hemiechinus* и далеко отстоит от *Erinaceus*. Этот результат подтверждает данные, полученные ранее с помощью другого молекулярного маркера [30]; 3) объединение длинноиглых ежей (*Paraechinus*) в одном роде с ушастыми (*Hemiechinus*) [31–33] неправомерно; 4) из группы африканских ежей ближе всего к роду *Erinaceus* находится южноафриканский вид *Atelerix frontalis*. Этот вывод наиболее неожиданный. По морфологическим критериям все три вида, составляющие род *Atelerix*, довольно близки между собой и сходны с родом *Erinaceus*. Иногда их включают в состав последнего [31, 34], но чаще признают самостоятельность рода *Atelerix*, считая его близким к *Erinaceus* [32, 33]. Существует также точка зрения, согласно которой южноафриканский еж *A. frontalis* и алжирский *A. algirus* должны быть выделены в отдельный род *Aethechinus* [35, 36], однако другие авторы ее не разделяют [31, 37]. Наши данные не согласуются ни с одним из этих вариантов, поскольку только два из этих видов группируются вместе (*A. algirus/A. albiventris*) и только отстоя-

щий от них *A. frontalis* действительно сближается с видами рода *Erinaceus*. Таким образом, южноафриканский еж по полученным данным представляет собой один род, а алжирский и центральноафриканский ежи – другой.

Рукокрылые. Характерная особенность фингерпринтов летучих мышей – высокая степень специфичности, т.е. преобладание уникальных фрагментов, свойственных только данным видам или общих для групп видов в пределах рода, над теми, которые объединяют родственные таксоны более высокого ранга, например все виды данного рода или сами роды. В результате при филогенетической обработке достоверная топология, поддерживаемая умеренными и высокими ИБ, была получена только на низких таксономических уровнях, в то время как на уровне таксонов родового и надродового ранга вследствие низкой бутстрэп-поддержки (менее 50%) топология оказалась неразрешенной, веероподобной. В качестве внешней группы использован подковонос *R. ferrumequinum* (рис. 5). Достоверно только обособление в составе Vespertilionidae двух больших сестринских кластеров, один из которых соответствует роду ночниц *Myotis* (85%), а другой собрал всех остальных гладконосых (65%). Обособление *Myotis* соответствует данным кариологии, которые выводят трибу *Myotini* по рангу на один уровень с подсемействами. Внутри *Myotis* достоверную поддержку получил кластер, в котором ночницы *M. csorbai* и *M. annamiticus* образовали сестринскую группу относительно *M. montivagus* (74 и 81% соответственно).

Внутри кластера, включившего все остальные роды Vespertilionidae, обособленные группировки, хотя и с не фиксированным положением на дендрограмме, образовали роды *Miniopterus* (100%), *Plecotus* (100%), *Vespertilio* (94%), *Nyctalus* (70%). Внимания заслуживает объединение в одном кластере *Scotomanes ornatus* и *Eptesicus serotinus* (80%). На возможность сведения этих родов в один или, по крайней мере, рассмотрения их в составе одной трибы говорят результаты кариологических и морфологических исследований [38, 39]. Интересно также расхождение видов *Pipistrellus* по разным кластерам. Один из них составили три европейских нетопыря: *P. pipistrellus/P. nathusii* (97%) + *P. kuhli* (61%), а другой – два азиатских вида нетопыря и кожановидный нетопырь, причем имело место следующее группирование: *Hypsugo pulveratus/H. savii* (69%) + *P. abramus* (52%). Объединению *Hypsugo pulveratus* и *H. savii* соответствует индекс генетического расстояния 0.82, характерный, как было показано выше, для далеких видов в пределах одного рода. Именно таких взглядов на таксономическое положение *H. pulveratus* придерживаются сейчас систематики [40], относящие этот вид к роду *Hypsugo*. Что же касается европейских видов нетопырей, то объедине-

ние *P. pipistrellus* и *P. nathusii* против *P. kuhli* соответствует широко принимаемой точке зрения о более близком родстве первых двух видов [41]. Помимо этих заключений, таксономическую ценность имеют следующие выводы: ночницы (*Myotis*) заслуживают ранга самостоятельного подсемейства (*Myotinae*); трубконосы (*Murinae*) и длиннокрылы (*Miniopterinae*) не заслуживают ранга самостоятельных семейств; *M. muricola* из Непала и Камбоджи являются разными видами.

Некоторые особенности, преимущества и ограничения интер-SINE-ПЦР

В настоящее время наиболее широкое распространение в молекулярной систематике получили маркеры анализа RAPD. Между тем, RAPD-фингерпринты не всегда воспроизводятся [42], а присутствующий им внутривидовой полиморфизм зачастую ведет к искажению генетических расстояний между таксонами надвидового ранга [43]. Методическое преимущество интер-SINE-ПЦР перед RAPD-анализом заключается в большей информативности и лучшей воспроизводимости результатов. Вследствие использования в RAPD-анализе очень коротких праймеров (9–11 нуклеотидов) этот метод оказывается чувствителен даже к небольшим отклонениям в условиях ПЦР, чем и объясняется часто наблюдаемая плохая воспроизводимость его результатов. Увеличение же длины случайного праймера в RAPD приводит к уменьшению числа считываемых фрагментов. Поэтому для получения достоверных и информативных результатов приходится ставить много реакций со многими короткими случайными праймерами, в то время как в интер-SINE-ПЦР для получения такого же и даже большего количества фрагментов достаточно реакции с единственным праймером.

Для использования интер-SINE-ПЦР необходимо знать консенсусную нуклеотидную последовательность хотя бы одного семейства SINEs, присущего изучаемой таксономической группе. При сопоставлении данного метода с RAPD это является недостатком интер-SINE-ПЦР, хотя и преодолимым. Во-первых, для млекопитающих может быть использован MIR-ПЦР благодаря наличию элемента MIR у всех представителей этого класса. Кроме того, большинства отрядов млекопитающих уже известны SINEs и их нуклеотидные последовательности [6–17 и ссылки в них]. Во-вторых, к настоящему времени созданы универсальные методы детекции и клонирования SINEs [44], которые позволяют достаточно быстро устанавливать нуклеотидные последовательности новых SINEs.

Применение MIR-ПЦР к анализу межвидового полиморфизма генома насекомых и летучих мышей позволило при одинаковых условиях экс-

перимента в случае второй группы получить значительно большее число амплифицированных фрагментов. Это согласуется с наблюдением Юрки с соавт. [14], что у насекомых, а также грызунов заметно меньше копий элемента MIR, чем у других млекопитающих. Авторы полагают, что пониженное число копий MIR объясняется их более сильной деградацией в этих группах. На наш взгляд, не менее вероятное объяснение заключается в том, что скорость амплификации элемента MIR в разных филогенетических ветвях неодинакова. Существенно большее число полос на фингерпринтах летучих мышей по сравнению с ежами не способствует, тем не менее, увеличению разрешения получаемого дерева. Это связано с малым числом общих полос, объединяющих те или иные роды в группе. Последнее может объясняться предположительно давней дивергенцией родов и/или особенно высокой скоростью мутаций ДНК летучих мышей.

Таким образом, следует признать, что таксономический уровень, для которого интер-SINE-ПЦР наиболее информативен и дает наиболее достоверные филогенетические данные, может отличаться в разных группах организмов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интер-SINE-ПЦР представляет собой простой и надежный метод изучения как филогенеза на видовом и родовом уровне, так и внутривидового полиморфизма.

Авторы признательны всем тем, кто оказал содействие или непосредственно участвовал в сборе зоологического материала для данного исследования. Неоценимую помощь при работе в Кавказском регионе оказали Р.И. Дзюев, В.Н. Василенко и другие сотрудники КБГУ. Важный материал был добыт благодаря коллегам из МГУ – В.А. Долгову, Н.А. Формозову и А.Б. Васильевой. Мы приносим благодарность д. б. н. В.В. Гречко за ценные замечания по содержанию работы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 00-04-49301 и 01-04-06493).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams G.K., Kubelik A.R., Livak J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. № 22. P. 6531–6535.
2. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple Sequence report (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. P. 176–183.
3. Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. № 21. P. 4407–4414.
4. Крамеров Д.А., Краев А.С., Рысков А.П., Скрябин К.Г. Первичная структура высокоповторяющейся последовательности ДНК мыши, гомоло-

- гичной двуспиральным участкам про-мРНК // Докл. АН СССР. 1980. Т. 252. С. 241–244.
5. *Singer M.F.* SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes // *Cell*. 1982. V. 28. P. 433–434.
 6. *Okada N.* SINEs // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1990. V. 1. P. 498–504.
 7. *Serdobova I.M., Kramerov D.A.* Short retroposons of the B2 superfamily: Evolution and application for the study of rodent phylogeny // *J. Mol. Evol.* 1998. V. 46. P. 202–214.
 8. *Крамеров Д.А.* Доказательство филогенетической близости семейств соневых и беличьих, основанное на изучении короткого ретропозона B1-dID // Докл. Акад. наук. 1999. Т. 364. № 2. С. 277–280.
 9. *Shimamura M., Yasue H., Ohshima K. et al.* Molecular evidence from retroposons that whales form a clade within even-toed ungulates // *Nature*. 1997. V. 388. P. 666–670.
 10. *Shedlock A.M., Okada N.* SINE insertions: powerful tools for molecular systematics // *BioEssays*. 2000. V. 22. № 2. P. 148–160.
 11. *Nelson D.L.* Interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction (IRS-PCR) for generation of human DNA fragments from complex sources // *Methods, Companion Methods Enzymol.* 1991. V. 2. P. 60–74.
 12. *Kaukinen J., Varvio S.-L.* Artiodactyl retroposons: Association with microsatellites and use in SINEmorph detection by PCR // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 2955–2958.
 13. *Smit A., Riggs A.* MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 1. P. 98–102.
 14. *Jurka J., Zietkiewicz E., Labuda D.* Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era // *Nucl. Acids Res.* 1995. V. 23. № 1. P. 170–175.
 15. *Gilbert N., Labuda D.* Evolutionary Inventions and Continuity of CORE-SINEs in Mammals // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 298. P. 365–377.
 16. *Buntjer J.B.* DNA repeats in the vertebrate genome as probes in phylogeny and species identification. Utrecht. Univ. (Netherlands), 1997. P. 1–130.
 17. *Borodulina O.R., Kramerov D.A.* Short interspersed elements (SINEs) from Insectivores. Two classes of mammalian SINEs distinguished by A-rich tail structure // *Mammalian Genome*. 2001. V. 12. P. 779–786.
 18. *Madsen O., Scally M., Douady C.J. et al.* Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals // *Nature*. 2001. V. 409. P. 610–614.
 19. *Killian J.K., Buckley T.R., Stewart N. et al.* Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the Theria // *Mamm. Genome*. 2001. V. 12. № 7. P. 513–517.
 20. *Кэррол Э.* Палеонтология и эволюция позвоночных. Т. 3. М.: Мир, 1993. С. 1–312.
 21. *Arrigi F.E., Bergendahl G., Mandel M.* Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // *Exptl Cell. Res.* 1968. № 50. P. 47–53.
 22. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
 23. *Swofford D.L.* PAUP*. Phylogenetic Analysis using parsimony (*and other methods) ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland (Massachusetts), 1998.
 24. *Van de Peer V., De Wachter R.* TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees // *Cabios*. 1994. V. 9. № 2. P. 177–182.
 25. *Link W., Dixens C., Sirigh M. et al.* Genetic diversity in European Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 27–32.
 26. *Corbett G.B., Hill J.E.* Mammals of the Indo-Malayan region. Systematic review. Oxford Univ. Press, 1992. 488 p.
 27. *Зайцев М.В.* К систематике и диагностике ежей подрода *Erinaceus* (Mammalia, Erinaceidae) фауны СССР // Зоол. журн. 1984. Т. 63. № 5. С. 720–729.
 28. *Filippucci M.G., Simson S.* Allozyme variation and divergence in Erinaceidae (Mammalia, Insectivora) // *Israel J. Zool.* 1996. V. 42. P. 335–345.
 29. *Santucci F., Emerson B.C., Hewitt G.M.* Mitochondrial DNA phylogeography of European hedgehogs // *Mol. Ecol.* 1998. V. 7. P. 1–10.
 30. *Банникова А.А., Федорова Л.В., Федоров А.Н. и др.* Сравнение повторяющихся последовательностей ДНК млекопитающих семейства Erinaceidae методом рестриктазного анализа // *Генетика*. 1995. Т. 31. № 11. С. 1498–1506.
 31. *Соколов В.Е.* Систематика млекопитающих. М.: Высш. школа, 1973. 432 с.
 32. *Frost D.R., Wozencraft W.C., Hoffmann R.S.* Phylogenetic relationships of hedgehogs and gymnures (Mammalia: Insectivora; Erinaceidae) // *Smithsonian Contribution to Zoology*. 1991. V. 518. P. 1–69.
 33. *Hutterer R.* Order Insectivora // *Mammal species of the World / Eds Wilson D.E., Reeder D.A.* Smithsonian Inst. Press, 1993. P. 69–130.
 34. *Yates T.L.* Insectivores: elephant shrews, tree shrews and dermopterans // *Orders and families of recent mammals of the World / Eds Anderson S., Knox J. N. Y.*, 1984. P. 117–144.
 35. *Anderson S., Jones K.* Recent Mammals of the World. N. Y.: Ronald Press Co., 1967.
 36. *Robbins C.B., Setzer H.W.* Morphometrics and distinctness of the hedgehog genera (Insectivora: Erinaceidae) // *Proc. Biol. Soc. (Washington)*. 1985. V. 98. P. 112–120.
 37. *Corbet G.B.* The family Erinaceidae; a synthesis of its taxonomy, phylogeny, ecology and zoogeography // *Mammal Rev.* 1988. V. 18. № 3. P. 117–172.
 38. *Volleth M.* Karyotype evolution and Phylogenie der Vespertilionidae (Mammalia: Chiroptera) // *Den Naturwissenschaftlichen Fakultaten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg zur Erlangung des Doktorgrades*. 1989. P. 1–262.
 39. *Volleth M., Heller K.-G.* Phylogenetic relationships of vespertilionid genera (Mammalia: Chiroptera) as re-

- vealed by karyological analysis // *Z. Zool. Syst. Evolut.-forsch.* 1994. V. 32. P. 11–34.
40. Hill J.E., Harrison D.L. The baculum in the Vespertilioninae (Chiroptera: Vespertilionidae) with a systematic review, a synopsis of *Pipistrellus* and *Eptesicus*, and the description of a new genus and subgenus // *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*. 1987. V. 52. P. 225–305.
41. Horacek I., Hanak V. Generic status of *Pipistrellus savii* and comments on classification of the genus *Pipistrellus* (Chiroptera, Vespertilionidae) // *Myotis*. 1985–1986. V. 23–24. P. 9–16.
42. Backeljau T., De Briun L., Wolf H. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods // *Cladistics*. 1995. V. 11. P. 119–130.
43. Rothuizen J., Van Wolveren M. Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display Mendelian transmission // *Anim. Genet.* 1994. V. 25. P. 13–18.
44. Borodulina O.R., Kramerov D.A. Wide distribution of short interspersed elements among eucaryotic genomes // *FEBS Lett.* 1999. V. 457. P. 409–413.

Using Inter-SINE-PCR to Study Mammalian Phylogeny

A. A. Bannikova¹, V. A. Matveev¹, and D. A. Kramerov²

¹ Department of Vertebrate Zoology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119899 Russia; e-mail: grechko@genome.eimb.relarn.ru

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

Results of the use of the fingerprinting method related to short interspersed elements (SINEs), inter-SINE-PCR, in the study of phylogenetic and taxonomic relationship in mammals from orders Chiroptera (family Vespertilionidae) and Lipotyphla (family Erinaceidae) are reported. The inter-SINE-PCR method is based on the amplification of fragments situated between copies of SINEs, which are short retroposons spaced 100 to 1000 bp apart. Specifically selected primers were used, which are complementary to consensus sequences of two short retroposons: the mammalian interspersed repeat (MIR), which is typical of all mammals and some other vertebrates, was used in the cases of bats and Erinaceidae, and the ERI-1 element recently isolated from the genome of the Daurian hedgehog was used in the case of Erinaceidae. The results support the current view on phylogenetic relationship between hedgehogs belonging to genera *Erinaceus*, *Hemiechinus*, and *Paraechinus* (but not the genus *Atelerix*). In bats, the phylogenetic reconstruction revealed a statistically valid topology only at lower taxonomic levels, whereas the topology for the genus and supragenus ranks was unresolved and fan-shaped. The benefits and limitations of the inter-SINE-PCR method are discussed.

Сдано в набор 01.03.2002 г.

Подписано к печати 06.05.2002 г.

Формат бумаги 60 × 88¹/₈

Офсетная печать

Усл. печ. л. 20.0

Усл. кр.-отт. 8.1 тыс.

Уч.-изд. л. 20.1

Бум. л. 10.0

Тираж 397 экз.

Зак. 6160

Свидетельство о регистрации № 012326 от 18.01.94 г. в Министерстве печати и информации Российской Федерации

Учредители: Российская академия наук,

Отделение общей биологии РАН и

Отделение физико-химической биологии РАН

Адрес издателя: 117997 Москва, Профсоюзная ул., 90

Отпечатано в ППП "Типография "Наука", 121099 Москва, Шубинский пер., 6