МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 591.557:599.322.2
DOI 10.21685/2307-9150-2018-4-8

С. В. Титов, А. А. Кузьмин, С. С. Закс, О. В. Чернышова

АПРОБАЦИЯ НОВОГО МАРКЕРА ЯДЕРНОЙ ДНК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ГИБРИДИЗАЦИИ КРАПЧАТОГО (*SPERMOPHILUS SUSLICUS* GÜLD.) И БОЛЬШОГО СУСЛИКОВ[1]

Аннотация.

Актуальность и цели. Исследование гибридных популяций в пространстве и времени является актуальной задачей эволюционной биологии и популяционной экологии. Несмотря на довольно успешное изучение современных гибридных зон сусликов (Rodentia, Sciuridae, Spermophilus) в Поволжье, в процессе слежения за гибридными популяциями постоянно возникают вопросы по использованию для этого молекулярно-генетических маркеров. Целью исследования было изучение эффективности применения ранее не используемого маркера яДНК – фрагмента гена HOX b5 – в диагностике видовой принадлежности особей в контактных поселениях большого и крапчатого сусликов.

Материалы и методы. Генетический материал для работы был собран в Ульяновской области в ходе проведения полевых работ по изучению гибридной зоны большого и крапчатого сусликов в 2018 г. Аналитическая выборка составила 28 особей *S. suslicus*, 41 особь *S. major* и 5 межвидовых гибридов, выявленных другими молекулярно-генетическими маркерами ранее. Полученные 69 фрагментов гена HOX b5 крапчатых и больших сусликов были секвенированы. Генетический анализ полученных последовательностей фрагмента гена HOX b5 был проведен при использовании пакета программ MEGA 7.0.21 и DnaSP 5.10. По полученным нуклеотидным последовательностям выявляли видоспецифические особенности этого маркера.

Результаты. Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HOX b5 (716 пн) больших сусликов (n = 41) выявил пять гаплотипов, а у крапчатых сусликов (n = 28) – только два гаплотипа – “Ss A” и “Ss G”. Проанализированный фрагмент ядерного маркера HOX b5 содержит как сайты, надежно дифференцирующие гаплотипы у каждого из гибридизирующих видов, так и сайт, имеющий специфическую для видов замену G–C (позиция 308), создающую участок узнавания рестрикционной эндонуклеазы *BmeI 3901*.

Выводы. Результаты проведенных исследований изменчивости нуклеотидных последовательностей гена HOX b5 у двух видов гибридизирующих сусли-

[1] Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 18-04-00687 а.

© 2018 Титов С. В., Кузьмин А. А., Закс С. С., Чернышова О. В. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

ков в Поволжье и выявление видоспецифических нуклеотидных особенностей этих последовательностей свидетельствуют о хорошей диагностической способности этого молекулярно-генетического маркера в исследовании генетического статуса особей из контактных поселений.

Ключевые слова: большой суслик, крапчатый суслик, межвидовая гибридизация, ядерная ДНК, ген HOX b5, рестрикционный анализ гибридов.

S. V. Titov, A. A. Kuz'min, S. S. Zaks, O. V. Chernyshova

TESTING A NEW NUCLEAR DNA MARKER FOR STUDIES OF HYBRIDIZATION IN SPECKLED (SPERMOPHILUS SUSLICUS GÜLD.) AND LARGE GROUND SQUIRRELS

Abstract.

Background. Researching hybrid populations in space and time is an urgent task of evolutionary biology and population ecology. Despite a rather successful study of modern hybrid zones of ground squirrels (Rodentia, Sciuridae, Spermophilus), there are questions about the use of molecular genetic markers in the process of observation of hybrid populations. The aim of the study was to study the effectiveness of the previously unused marker of the nuclear DNA fragment of the HOX B5 gene in the diagnosis of species belonging to individuals in the contact colonies of large and speckled ground squirrels.

Materials and methods. Genetic material was collected in Ulyanovsk region during the expedition to study the hybrid zone of large and speckled ground squirrels in 2018. An analytical sample included 28 individuals of S. suslicus, 41 individuals S. major and 5 interspecific hybrids identified by other molecular genetic markers. The obtained 69 HOX b5 gene fragments of large and speckled ground squirrels were sequenced. A genetic analysis of the obtained sequence of HOX B5 gene fragment was carried out using MEGA 7.0.21 and DnaSP 5.10 software package. The obtained nucleotide sequences revealed species-specific features of this marker.

Results. The analysis of the nucleotide sequences of a fragment of the gene HOX b5 (716 bp) in large ground squirrels (n = 41) revealed 5 haplotypes, and in speckled ground squirrels (n = 28) – only two haplotype. The analyzed fragment of the nuclear marker HOX b5 contains both sites that reliably differentiate haplotypes in each of the hybridizing species, and a site that has a species-specific replacement G–C (position 308), creating a site for recognition of the restriction endonuclease *BmeI 3901*.

Conclusions. The results indicate a good diagnostic ability of this molecular genetic marker in the study of the genetic status of individuals from contact colonies on the conducted studies of the variability of nucleotide sequences of the HOX B5 gene in two species of hybridizing ground squirrels and the identification of species-specific nucleotide features of these sequences.

Keywords: large ground squirrel, speckled ground squirrel, interspecific hybridization, nuclear DNA, HOX b5 gene, PCR-RFLP analysis of hybrids.

Исследование гибридных популяций в пространстве и времени является актуальной задачей эволюционной биологии и популяционной экологии [1–3]. Такие целенаправленные исследования необходимы для понимания механизма процесса естественной межвидовой гибридизации, а также для выявления последствий смешения видоспецифических генотипов для попу-

ляции и видов в целом [4–6]. Использование в исследованиях гибридных и смешанных популяций молекулярно-генетических маркеров ядерной и митохондриальной ДНК (выявляющих гибридное происхождение, направление и силу интрогрессии генов), а также микросателлитной ДНК (выявляющих индивидуальный полиморфизм, родство и родственные связи особей) в исследованиях такого рода поднимает решение указанных проблем на совершенно иной уровень [7–10].

Изучение структуры и состава населения гибридных, смешанных и одновидовых поселений млекопитающих с целью построения истории популяционной динамики максимально информативно при использовании «биографического» метода [11], базирующегося на исследованиях статуса особей без изъятия их из популяции и при условии полного их отлова. Проводимая таким образом прижизненная диагностика происхождения и популяционного статуса каждой конкретной особи в популяции позволяет получить максимальный объем информации и, что самое главное, не искажает популяционную ситуацию в результате изъятия особи из популяции.

Несмотря на довольно успешное изучение современных гибридных зон сусликов (Rodentia, Sciuridae, Spermophilus) в Поволжье, в частности гибридизации большого (*Spermophilus major*) и крапчатого (*S. suslicus*), большого и желтого (*S. fulvus*) сусликов [12–15], в процессе слежения за гибридными популяциями постоянно возникают вопросы по использованию для этого молекулярно-генетических маркеров. Используемые диагностирующие видовую принадлежность наборы маркеров, хорошо работающие при изучении гибридизации в одной паре скрещивающихся видов, не всегда эффективны в применении для другой пары видов. Так, в исследованиях гибридной зоны сусликов нами были использованы два маркера мтДНК (D-loop, Cyt b), два маркера яДНК (6 интрон гена p53, псевдоген p53), два маркера половых хромосом (SmcY, Z*f*Y(X)) и девять маркеров микросателлитной ДНК [13, 14]. Как показали пробные исследования, для пары гибридизирующих видов сусликов «большой – желтый» все перечисленные маркеры были эффективны в использовании. В отличие от этого для пары «большой – крапчатый» маркер яДНК псевдоген p53 оказался непригодным вследствие его отсутствия у крапчатого суслика. Поэтому возникла методическая задача поиска еще одного диагностического маркера яДНК для этой пары контактирующих видов.

Целью исследования было изучение эффективности применения ранее не используемого маркера яДНК – фрагмента гена HOX b5 – в диагностике видовой принадлежности особей в контактных поселениях большого и крапчатого сусликов.

Материалы и методы

Генетический материал для работы был собран в Ульяновской области в ходе проведения полевых работ по изучению гибридной зоны большого и крапчатого сусликов в 2018 г. Аналитическая выборка составила 28 особей *S. suslicus*, 41 особь *S. major* и пять межвидовых гибридов, выявленных другими молекулярно-генетическими маркерами ранее.

Молекулярно-генетические исследования проводили на базе лаборатории молекулярной экологии и систематики животных кафедры зоологии и экологии Пензенского государственного университета.

ДНК выделяли из образцов ткани, зафиксированных после биопсии в этаноле (96 %) по общепринятой хлороформ-фенольной методике [16]. Полимеразную цепную реакцию (PCR) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Трис-HCl (pH 8,9), 20 мМ сульфата аммония, 20 мкМ ЭДТА, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мкМ каждого из них), 2 мМ хлористого магния, 0,6 мкМ каждого из праймеров, 0,1–0,2 мкг ДНК и 2 ед. акт. Taq-полимеразы.

В качестве молекулярно-генетического маркера для диагностики происхождения особей был использован фрагмент гена HOX b5, кодирующий гомеодоменные белки, уже использованный нами ранее для описания генетической структуры популяций крапчатого суслика.

В работе были использованы специфические для сусликов праймеры, применяемые для амплификации фрагментов HOX b5: HOX 5D – 5'-agactcctca gatattcccc-3' и HOX 5R – 5'-gaactccttctccagctcca-3'. Реакцию проводили при условиях – 94 ºС – 1 мин, 62 ºС – 1 мин (отжиг), 72 ºС – 3 мин (30 циклов). Впоследствии полученные таким образом PCR-продукты были подвергнуты электрофоретическому разделению в 6 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) с целью качественного подтверждения прохождения реакции и выделения проб каждого образца для последующего секвенирования. Полученные таким образом 69 фрагментов гена HOX b5 крапчатых и больших сусликов были секвенированы на генетическом анализаторе ABI 3500 при использовании реактива BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits.

Генетический анализ полученных последовательностей фрагмента гена HOX b5 был проведен при использовании пакета программ MEGA 7.0.21 [17] и DnaSP 5.10 [18]. По полученным нуклеотидным последовательностям выявляли видоспецифические особенности этого маркера.

Результаты и обсуждение

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HOX b5 (716 пн) больших сусликов (n = 41) выявил пять гаплотипов (табл. 1). При этом гаплотипическое разнообразие (H_d) проанализированной выборки составило 0,626, нуклеотидное разнообразие (Pi) – 0,00118, а среднее число нуклеотидных различий (k) – 0,841.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена HOX b5 (716 пн) крапчатых сусликов (n = 28) выявил только два гаплотипа – “Ss A” и “Ss G” (см. табл. 1). При этом показатели генетического разнообразия этой выборки оказались значительно ниже по сравнению с показателями у большого суслика – 0,443, 0,00062 и 0,443 соответственно.

Как видно из полученных, данных последовательность проанализированного фрагмента ядерного маркера HOX b5 содержит как сайты, надежно дифференцирующие гаплотипы у каждого из гибридизируюших видов, так и сайт, имеющий специфическую для видов замену G–C (позиция 308), создающую участок узнавания рестрикционной эндонуклеазы *BmeI 3901*. Эту генетическую особенность можно использовать для диагностирования гибридного происхождения особей в контактных поселениях большого и крапчатого сусликов, что и было показано в ходе проверочного эксперимента (рис. 1). При рестрикции последовательностей гена HOX b5 больших сусликов получаются три фрагмента ~360 пн, ~205 пн и ~110 пн. Для крапчатых

сусликов рестрикционный спектр иной – ~360 пн, ~110 пн и ~95 пн. У особей гибридного происхождения отмечается наличие фрагментов обоих родительских видов.

Таблица 1

Гаплотипы фрагмента ядерного гена HOX b больших (n = 41) и крапчатых (n = 28) сусликов из правобережного Среднего Поволжья

Гаплотип								N, %
		1	1	1	3	3	5	
		2	7	8	0	3	7	
	1	1	6	2	8	9	3	
Большой суслик								
Hap Sm 1	T	G	G	T	C	T	G	21, 51.2
Hap Sm 2	·	A	·	·	·	·	·	14, 34.2
Hap Sm 3	A	A	·	·	·	·	·	1, 2.4
Hap Sm 4	A	·	·	·	·	·	·	4, 9.8
Hap Sm 5	·	·	·	G		A	A	1, 2.4
Крапчатый суслик								
Hap Ss A	–	·	A	·	G	·	·	19, 67.9
Hap Ss G	–	·	·	·	G	·	·	9, 32.1

Примечание. Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и номер их позиций в последовательности. Не закрашенные колонки – замены, характерные для большого суслика, закрашенная серым – тоже самое для крапчатого, закрашенная красным – замены диагностирующая виды.

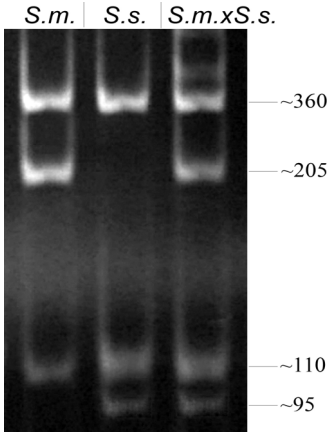

Рис. 1. Результаты рестрикционного анализа ПЦР-фрагментов гена HOX b5 (*BmeI 3901*) больших (S.m.), крапчатых (S.s.) сусликов и их гибридов (S.m.×S.s.) из контактного поселения

Таким образом, результаты проведенных исследований изменчивости нуклеотидных последовательностей гена HOX b5 у двух видов гибридизирующих сусликов в Поволжье и выявление видоспецифических нуклеотид-

ных особенностей этих последовательностей свидетельствуют о хорошей диагностической способности этого молекулярно-генетического маркера в исследовании генетического статуса особей из контактных поселений.

Библиографический список

1. **Hewitt, G. M.** Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies / G. M. Hewitt // Trends Ecol. Ev. – 1988. – № 3. – P. 158–167.
2. **Barton, N. H.** Adaptation, speciation and hybrid zones / N. H. Barton, G. M. Hewitt // Nature. – 1989. – Vol. 341. – P. 497–503.
3. **Hewitt, G. M.** Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time / G. M. Hewitt // Mol. Ecol. – 2001. – № 10. – P. 537–549.
4. **Harrison, R. G.** Hybrid zones: windows on the evolutionary process / R. G. Harrison // Ox. surv. Ev. Biol. – 1990. – № 7. – P. 69–128.
5. **Barton, N. H.** The role of hybridization in evolution / N. H. Barton // Mol. Ecol. – 2001. – № 10. – P. 551–568.
6. **Howard, D. J.** Evolution in hybrid zones / D. J. Howard, S. C. Britch, W. E. Braswell, J. L. Marschall // The Evoiution of Population Biology / ed. R. K. Singh, M. K. Uyenoyama. – Cambridge : Cambridge University Press, 2003. – P. 297–314.
7. **Queller, D. C.** Microsatellites and kinship / D. C. Queller, J. E. Strassmann, C. R. Hughes // Trends Ecol. Ev. – 1993. – № 8. – P. 285–288.
8. **Рысков, А. П.** Мультилокусный ДНК-фингерпринтинг в генетико-популяционных исследованиях биоразнообразия / А. П. Рысков // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33, № 6. – С. 880–892.
9. **Sunnucks, P.** Efficient genetic markers for population biology / P. Sunnucks // Trends Ecol. Ev. – 2000. – Vol. 15, № 5. – P. 199–203.
10. **Funk, D. J.** Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA / D. J. Funk, K. E. Omland // Annu Rev. Ecol. Ev. Syst. – 2003. – Vol. 34. – P. 397–423.
11. **Овсяников, Н. Г.** Биографический метод в изучении популяции млекопитающих / Н. Г. Овсяников // Методы исследования в экологии и этологии : сб. тр. – Пущино : Науч. центр биол. исслед., 1986. – С. 157–168.
12. **Кузьмин, А. А.** Зона гибридизации большого (*Spermophilus major* Pall., 1778) и крапчатого (*S. suslicus* Güld., 1770) сусликов: экологические, поведенческие и генетические особенности : автореф. дис. … канд. биол. наук / Кузьмин А. А. – М. : Изд-во МГУ, 2009. – 24 с.
13. **Титов, С. В.** Популяционные и генетические механизмы межвидовой гибридизации млекопитающих (на примере рода Spermophilus) : автореф. дис. … д-ра биол. наук / Титов С. В. – М. : Изд-во МГУ, 2009. – 48 с.
14. **Шмыров, А. А.** Гибридизация большого и желтого сусликов (экологические и генетические аспекты) : автореф. дис. … канд. биол. наук / Шмыров А. А. – М. : ИПЭЭ РАН, 2009. – 24 с.
15. Динамика ареалов и современное состояние поселений наземных беличьих в правобережных районах Поволжья / С. В. Титов, А. А. Кузьмин, Р. В. Наумов, О. А. Ермаков, С. С. Закс, О. В. Чернышова. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2015. – 124 с.
16. **Sambrook, J.** Molecular cloning: A laboratory Manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989. – P. 58–64.
17. Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies / K. Tamura, F. U. Battistuzzi, P. Billing-Ross, O. Murillo, A. Filipski, S. Kumar // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – № 109. – P. 19 333–19 338.
18. **Librado, P.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data / P. Librado, J. Rozas // Bioinformatics. – 2009. – 25 (11). – P. 1451, 1452.

References

1. Hewitt G. M. *Trends Ecol. Ev.* 1988, no. 3, pp. 158–167.
2. Barton N. H., Hewitt G. M. *Nature*. 1989, vol. 341, pp. 497–503.
3. Hewitt G. M. *Mol. Ecol*. 2001, no. 10, pp. 537–549.
4. Harrison R. G. *Ox. surv. Ev. Biol*. 1990, no. 7, pp. 69–128.
5. Barton N. H. *Mol. Ecol*. 2001, no. 10, pp. 551–568.
6. Howard D. J., Britch S. C., Braswell W. E., Marschall J. L. *The Evoiution of Population Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 2003, pp. 297–314.
7. Queller D. C., Strassmann J. E., Hughes C. R. *Trends Ecol. Ev*. 1993, no. 8, pp. 285–288.
8. Ryskov A. P. *Molekulyarnaya biologiya* [Molecular biology]. 1999, vol. 33, no. 6, pp. 880–892.
9. Sunnucks P. *Trends Ecol. Ev*. 2000, vol. 15, no. 5, pp. 199–203.
10. Funk D. J., Omland K. E. *Annu Rev. Ecol. Ev. Syst*. 2003, vol. 34, pp. 397–423.
11. Ovsyanikov N. G. *Metody issledovaniya v ekologii i etologii: sb. tr.* [Researchmethods in ecology and ethology: collected articles]. Pushchino: Nauch. tsentr biol. issled., 1986, pp. 157–168.
12. Kuz'min A. A. *Zona gibridizatsii bol'shogo (Spermophilus major Pall., 1778) i krapchatogo (S. suslicus Güld., 1770) suslikov: ekologicheskie, povedencheskie i geneticheskie osobennosti: avtoref. dis. kand. biol. nauk* [The hybridization area of large (Spermophilus major Pall., 1778) and speckled (S. suslicus Güld., 1770) ground squirrels: author's abstract of dissertation to apply for the degree of the candidate of biological sciences]. Moscow: Izd-vo MGU, 2009, 24 p.
13. Titov S. V. *Populyatsionnye i geneticheskie mekhanizmy mezhvidovoy gibridizatsii mlekopitayushchikh (na primere roda): avtoref. dis. d-ra biol. nauk* [Population and genetic mechanisms of interspecies hybridization of mammals (by the example of *Spermophilus* genus): author's abstract of dissertation to apply for the degree of the doctor of biological sciences]. Moscow: Izd-vo MGU, 2009, 48 p.
14. Shmyrov A. A. *Gibridizatsiya bol'shogo i zheltogo suslikov (ekologicheskie i geneticheskie aspekty): avtoref. dis. kand. biol. nauk* [Hybridization of large and yellow ground squirrels (ecological and genetic aspects): author's abstract of dissertation to apply for the degree of the candidate of biological sciences]. Moscow: IPEE RAN, 2009, 24 p.
15. Titov S. V., Kuz'min A. A., Naumov R. V., Ermakov O. A., Zaks S. S., Chernyshova O. V. *Dinamika arealov i sovremennoe sostoyanie poseleniy nazemnykh belich'ikh v pravo berezhnykh rayonakh Povolzh'ya* [Habitat dynamics and modern conditions of settlements of ground squirrels on the right bank of Volga region]. Penza: Izd-vo PGU, 2015, 124 p.
16. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989, pp. 58–64.
17. Tamura K., Battistuzzi F. U., Billing-Ross P., Murillo O., Filipski A., Kumar S. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, no. 109, pp. 19 333–19 338.
18. Librado P., Rozas J. *Bioinformatics*. 2009, 25 (11), pp. 1451, 1452.

Титов Сергей Витальевич
доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии и экологии, декан факультета физико-математических и естественных наук, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: svtitov@yandex.ru

Titov Sergey Vital'evich
Doctor of biological sciences, professor, head of sub-department of zoology and ecology, dean of the Faculty of Physics, Mathematics and Natural Sciences, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Кузьмин Антон Алексеевич
кандидат биологических наук, доцент, кафедра биотехнологий и техносферной безопасности, Пензенский государственный технологический университет (Россия, г. Пенза, проезд Байдукова/ул. Гагарина, 1а/11)

E-mail: kuzmin-puh@yandex.com

Kuz'min Anton Alekseevich
Candidate of biological sciences, associate professor, sub-department of biotechnology and technosphere safety, Penza State Technological University (1a/11 Baidukova lane/Gagarina street, Penza, Russia)

Закс Светлана Сергеевна
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Научно-учебная лаборатория молекулярной экологии и систематики животных, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: s.s.zaks@yandex.ru

Zaks Svetlana Sergeevna
Candidate of biological sciences, senior researcher, research and educational laboratory of molecular ecology and systematics of animals, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Чернышова Ольга Валерьевна
аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: oliarabbit@yandex.ru

Chernyshova Ol'ga Valer'evna
Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

УДК 591.557:599.322.2
Титов, С. В.
Апробация нового маркера ядерной ДНК для исследований гибридизации крапчатого (*Spermophilus suslicus* Güld.) и большого сусликов / С. В. Титов, А. А. Кузьмин, С. С. Закс, О. В. Чернышова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2018. – № 4 (24). – С. 72–79. – DOI 10.21685/2307-9150-2018-4-8.