

ФЕНОМЕН ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ 18S рДНК У ОСЕТРОВ АМУРА

Рожкован К.В.

Результаты проведенных исследований позволили в значительной мере дополнить и расширить представления о характере молекулярной эволюции кодирующих последовательностей 18S рДНК, что необходимо для понимания механизмов согласованной эволюции дублированных генов и эволюционной судьбы псевдогенных последовательностей.

Phenomenon of intraindividual variability of 18S rDNA in sturgeons of Amur River. K.V. ROZHKOVAN (Institute of Biology and Soil Sciences, FEB RAS, Vladivostok).

Information about evolution of coding 18S rDNA sequences was essentially extended by data submitted, this is necessary to understand mechanisms of concerted evolution of duplicated genes and evolutionary fate of pseudogenic sequences.

Рибосомная ДНК (рДНК) - классический пример генной дупликации, который может быть использован в качестве модели для тестирования теории согласованной эволюции [2]. Эволюционная динамика тандемно повторяющихся последовательностей мультигенного семейства рДНК вызывает неизменный интерес многих исследователей с момента своего открытия; генные дупликации принято рассматривать как основной эволюционный путь приобретения новых функций [1]. Кодированные регионы рДНК широко используются в качестве молекулярных маркеров для филогенетических исследований эукариот, поскольку большинство их мутаций в результате согласованной эволюции (через механизмы рекомбинации) быстро фиксируются внутри популяции или вида в процессе дифференциации [2]. Интенсивное исследование этих маркеров обнаружило, что у небольшого числа организмов регистрируется несколько (2-3) вариантов ядерного гена 18S рРНК [3, 7]. Поэтому открытие множественных аллелей этого гена у северо-американских осетровых рыб (род *Acipenser*) [4, 5] оказалось весьма неожиданным. В настоящее время не существует четкого объяснения данного феномена, а также его отсутствия у ближайших филогенетических родственников осетров, таких как веслоносы (род *Polyodon*); бесспорным остается лишь тот факт, что механизмы согласованной эволюции в геномах осетровых рыб не смогли реализоваться в полной мере.

К началу наших исследований оставалось неясным, имеют ли другие виды осетров, кроме североамериканских, такие же особенности эволюции рДНК, или данный феномен им не присущ, подобно видам *Polyodon*. Цель нашей работы состояла в исследовании разнообразия рДНК у двух видов осетровых рыб Амура, амурского осетра *Acipenser schrenckii* Brandt, 1869 и калуги *Huso dauricus* (Georgi, 1775), а также межвидовых гибридов амурского осетра с сибирским осетром и с калугой.

Участки последовательностей 18S рДНК размером 486 пн (позиции 960-1444 пн полноразмерного гена) осетров амплифицировали с помощью универсальных праймеров; PCR-продукты клонировали и секвенировали на автоматическом лазерном секвенаторе ABI PRISM 310 (на базе БПИ ДВО РАН). Результаты исследований объединяли с имеющимися данными из GenBank и обрабатывали с помощью пакетов статистических программ (DnaSP, Arlequin).

Полученные данные продемонстрировали высокое разнообразие последовательностей 18S рДНК осетров Амура, сопоставимое с таковым североамериканского озерного осетра *A. fulvescens* (табл. 1), причем основную часть (более 70%) составляла внутривидовая компонента. Следовательно, у дальневосточных видов осетровых рыб также отсутствуют эффективные механизмы согласованной

эволюции кодирующих последовательностей 18S рДНК. Примечательно, что характер распределения нуклеотидного разнообразия вдоль исследованного фрагмента рДНК у осетров Амура такой же, как у североамериканского озерного осетра, включая наличие консервативной области между 100 и 200 нуклеотидными позициями (рис. 1 а).

Таблица 1.

Средние значения полиморфизма последовательностей 18S рДНК осетровых рыб

Группы сравнения	n	S	h	Hd	Pi	k
Виды	78	44	34	0.871	0.01123	5.335
Гибриды	40	50	29	0.955	0.01530	7.373
Гены (видов)	31	9	6	0.301	0.00120	0.581
Псевдогены (видов)	47	38	28	0.944	0.01117	5.306

Примечание: n – число клонов, S – число полиморфных (сегрегирующих) сайтов, h – число гаплотипов (аллельных вариантов), Hd – гаплотипическое разнообразие, Pi – нуклеотидное разнообразие, k – среднее число нуклеотидных различий.

Существует предположение, что реализация механизмов согласованной эволюции осложняется межвидовой гибридизацией [6]. Поэтому далее был проведен анализ изменчивости 18S рДНК двух межвидовых гибридов осетровых рыб: *A. schrenckii* x *A. baerii* и *A. schrenckii* x *H. dauricus*. Результаты показали, что гибриды, по сравнению с исходными видами действительно являются более полиморфными, хотя характер распределения нуклеотидного разнообразия (включая консервативный участок) вдоль исследуемого фрагмента рДНК у них в основном сохраняется (рис. 1 б). Несмотря на повышенную изменчивость, фиксированных отличий у гибридов по сравнению с родительскими видами обнаружено не было. Вместе с тем, значительная часть изменчивости гибридов была обнаружено в сайтах, инвариантных у их родителей. Более того, несколько мутаций оказались общими с представителями других таксонов - так называемый эффект появления у гибридов признаков предковых форм. Дифференциация гибридов с родительскими видами, а также между собой оказалась ниже межвидовой дифференциации: они разделяли между собой более 90% общего генетического разнообразия. Следовательно, механизмы согласованной эволюции действительно становятся менее эффективными при высоких потоках генов, обусловленных межвидовой гибридизацией.

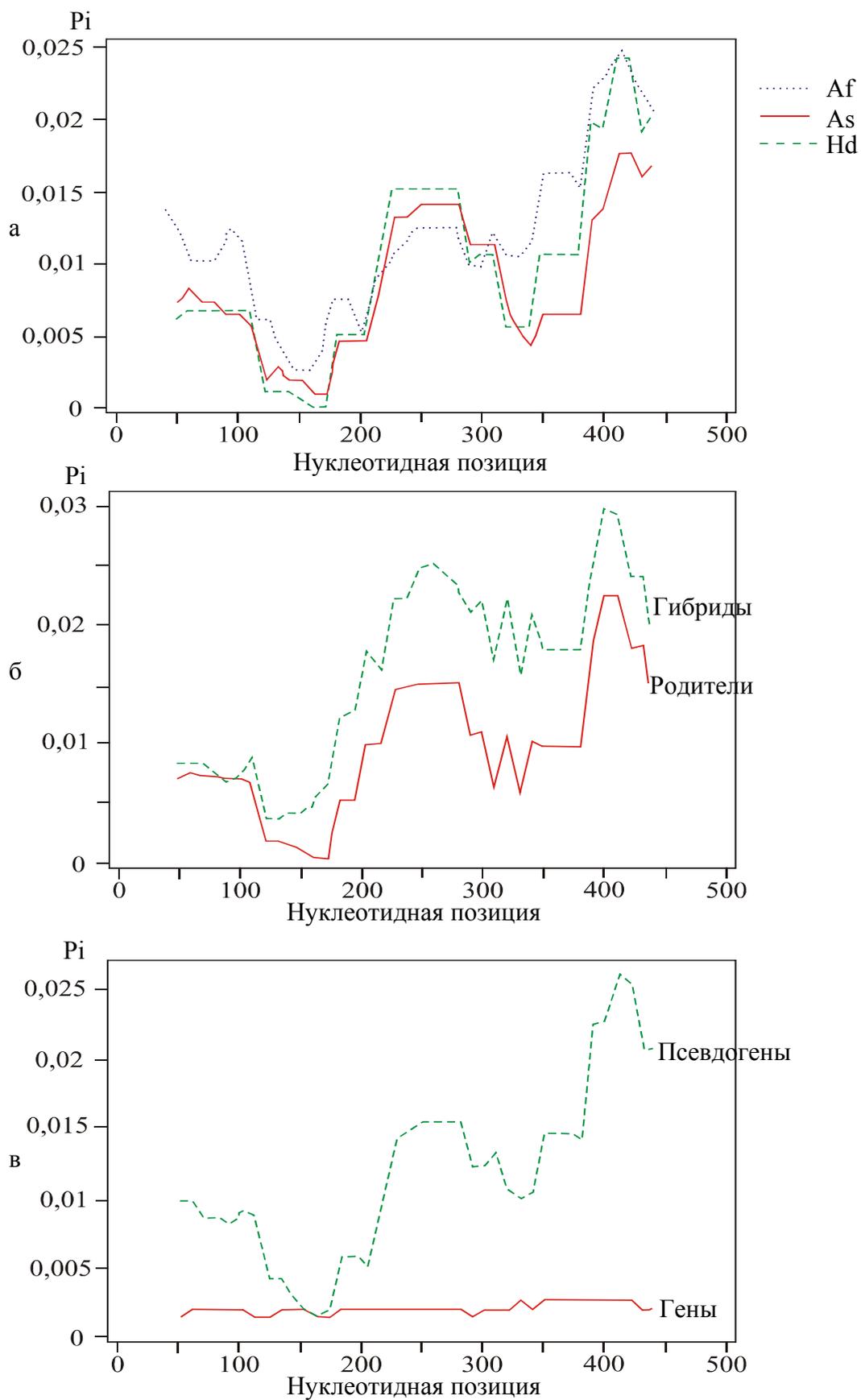


Рисунок 1. Распределение нуклеотидного разнообразия у разных видов (а) гибридов по сравнению с родителями (б) и у генов и псевдогенов (в)

Альтернативным источником внутригеномного полиморфизма рДНК может быть присутствие псевдогенных последовательностей, которые утрачивают свои функции, и как следствие имеют пониженные селективные ограничения и повышенную аккумуляцию мутаций [8]. В этой связи был проведен филогенетический анализ клонированных 486 пн последовательностей 18S рДНК для шести видов осетровых рыб, включая собственные данные по *A. schrenckii* и *H. dauricus*, а также имеющиеся данные из GenBank по другим представителям Acipenseriformes. Филогенетические реконструкции распределили все последовательности рДНК в два кластера (рис. 2), которые были условно названы “генами” и “псевдогенами”, т.к. они включали функциональные и нефункциональные последовательности гена 18S рРНК *A. fulvescens*, соответственно. По разным критериям полиморфизм рДНК “псевдогенов” оказался в 3-10 раз выше, чем у “генов” (см. таб. 1). Распределение нуклеотидного разнообразия у “генов” и “псевдогенов” разительно отличается (рис. 1 в), причем изменчивость “генов” минимальна на всем отрезке анализируемого фрагмента. Дифференциация кластеров заметно выше, чем видов: гены и псевдогены имеют лишь около 50% общего генетического разнообразия. Результаты анализа ряда тестов (таб. 2) показывают, что последовательности сравниваемых кластеров подвергаются разному селективному давлению, соответственно их предполагаемой функциональной значимости.

Таблица 2.

Характер нуклеотидных замен и тесты на нейтральность для генов и псевдогенов.

Группа сравнения	ZnS	C→T+G→A: Другие замены	L
Гены	0.182	1:1	0.0034
Псевдогены	0.082	1:2.5	0.0126

Примечание: ZnS - тест на нейтральность, L - относительная скорость эволюции.

Чтобы проверить потенциальный вклад изменчивости последовательностей в структуру и функцию, мы оценили распределение нуклеотидных замен в разных последовательностях между консервативными и вариабельными участками; в этих целях использовали генерализованную модель вторичной структуры эукариотической молекулы

18S рРНК. Результаты показали, что основная часть изменчивости “псевдогенов” (делеции, инсерции, транзиции, трансверсии) концентрируется в переменных участках (область V5 и V7 канонической структуры); у “генов” мутации в консервативных областях отсутствуют. Тем не менее, среди последовательностей “псевдогенов” не обнаружено мутаций, которые бы однозначно свидетельствовали об их функциональной непригодности.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в геномах осетровых рыб Амура содержится множество копий кодирующих последовательностей 18S рДНК, образующихся вероятно из-за неэффективности механизмов согласованной эволюции. Это разнообразие повышает межвидовая гибридизация, которая у осетровых рыб в естественных условиях происходит достаточно легко. Разные аллельные варианты 18S ДНК эволюционируют с различными ограничениями, что предполагает наличие среди них как генов, так и псевдогенов. Полученные результаты необходимы для понимания механизмов согласованной эволюции дублированных генов и судьбы псевдогенных последовательностей. В совокупности с имеющимися в литературе данными они позволяют предполагать, что основное назначение “псевдогенных” последовательностей - улучшение свойств функциональной последовательности гена, что является очень важным для адаптации вида в постоянно изменяющейся среде обитания. Все это свидетельствует о перспективности и высокой теоретической и практической значимости проводимых исследований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Президиума ДВО РАН (проект “Амур-7” в составе гранта “Амурская экспедиция”).

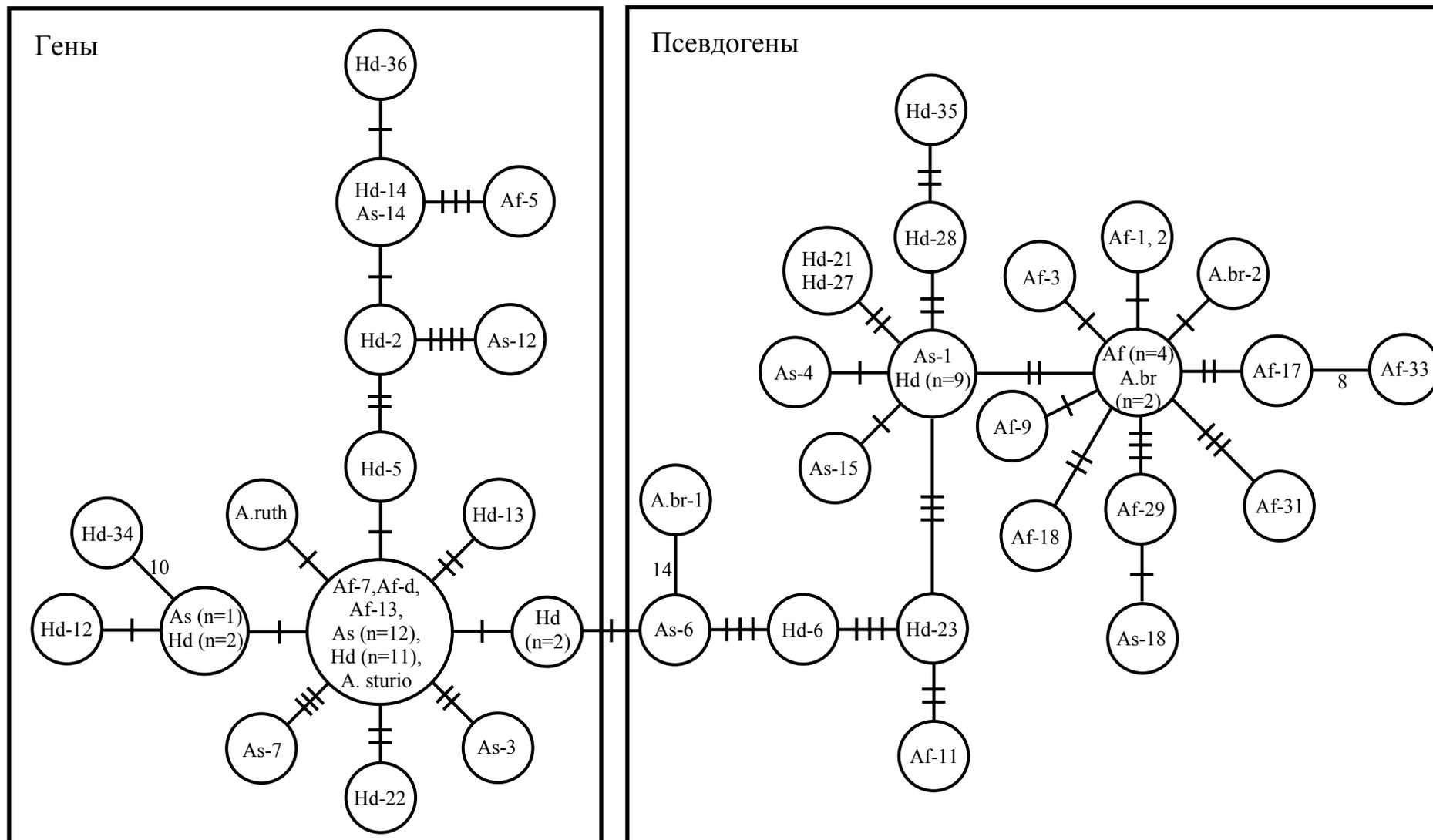


Рис. 2. MST-реконструкция филогенетических связей последовательностей 18S рДНК шести видов осетровых рыб: Af - *Acipenser fulvescens*, As - *A. schrenckii*, A.br - *A. brevirostrum*, A.ruth- *A. ruthenus*, Hd - *Huso dauricus* (цифрами обозначены номера клонов)

ЛИТЕРАТУРА

1. Dame J.B., Sullivan M., McCutchan T.F. Two major sequence classes of ribosomal RNA genes in *Plasmodium berghei* // Nuc. Acid. Res. 1984. V. 12. P. 5943-5952.
2. Hillis D.M., Davis S.K. Ribosomal DNA: intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction // Syst. Zool. 1988. V. 37. P. 63-66.
3. Keller I., Chintauan-Marquier I.C., Veltsos P., Nichols R.A. Ribosomal DNA in the Grasshopper *Podisma pedestris*: Escape From Concerted Evolution // Genetics. 2006. V. 174. P. 863-874.
4. Krieger J., Fuerst P.A. Evidence of multiple alleles of the nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon (Family: Acipenseridae) // J. Appl. Ichthyol. 2002. V. 18. P. 290-297.
5. Krieger J., Fuerst P.A. Diversity of nuclear 18S rRNA gene sequences within individuals in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) // J. Appl. Ichthyol. 2004. V. 20. P. 433-439.
6. Márquez LM, Miller DJ, MacKenzie JB, Van Oppen MJH. Pseudogenes contribute to the extreme diversity of nuclear ribosomal DNA in the hard coral *Acropora* // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 71077–1086
7. Muir G, Fleming CC, Schlötterer C. Three divergent rDNA clusters predate the species divergence in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Mol Biol Evol.* 2001;18:112–119.
Muir G., Fleming C.C., Schlotterer C. //Mol. Biol. Evol. 2001. V. 18. P. 112-119.
8. Rodin S.N., Riggs A.D. Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication // Mol. Evol. 2003. V. 56. P. 718-729