

УДК 574.669.21

А. Г. ДАВОЯН

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА (GATA)_n-СОДЕРЖАЩИХ
ЛОКУСОВ ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЯЩЕРИЦ
Darevskia dahli (сем. Lacertidae)

Проблема генезиса мини- и микросателлитных локусов, интенсивно изучаемая на человеке и некоторых других двуполых видах, практически не исследована на видах с клональным типом размножения. В настоящей работе проведен анализ полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления внутривидового полиморфизма двух локусов *D. dahli*: *Du 215* и *Du 281*, содержащих (GATA)_n-микросателлитный кластер. Обнаружен разный уровень внутри- и межпопуляционной изменчивости исследованных локусов. Наиболее полиморфным (8 аллельных вариантов) оказался локус *Du 215*. Три аллельных варианта показаны для локуса *Du 281*. Праймеры, подобранные для локусов *Du 215* и *Du 281*, были также использованы для ПЦР-анализа гомологичных локусов двух предполагаемых родительских двуполых видов *D. mixta* и *D. portschinski*. Показано, что ПЦР-продукты соответствующих локусов родительских видов имеют примерно такие же размеры. Эти данные о структуре локусов ДНК позволяют изучить генетическое разнообразие у партеновида *D. dahli*.

Микросателлиты (GATA)_n широко представлены в геноме эукариот. Активное изучение (GATA)_n-повторов связано с их высокой вариабельностью у всех исследованных эукариотических организмов [1]. Партеногенетические виды ящериц, генотипы которых клонально воспроизводятся из поколения в поколение, являются удачной моделью для изучения изменчивости в гипервариабельных локусах.

Darevskia dahli – один из четырех партеногенетических видов ящериц рода *Darevskia*, обитающий в северной и северо-восточной части Армении [2], возникший в результате межвидовой гибридизации двуполых видов *D. portschinski* и *D. mixta* [3, 4]. Внутри ареала этот вид образует ряд популяций, расположенных в сейсмически активных районах. Ранее были выявлены различные дискретные вариации фолидоза головы и анальной области, возрастание направленной асимметрии билатеральных структур фолидоза при изучении ящериц *D. dahli*, обитающих в сейсмически активных районах (Степанаван) [5]. В настоящей работе с целью более подробного изучения этого явления применен локус-специфический анализ полимеразной цепной

реакции (ПЦР) для выявления генетического полиморфизма вида *D. dahli*. Впервые с помощью этого метода был выявлен внутривидовой полиморфизм у партеновида *D. dahli* по двум локусам ядерного генома: *Du 215* и *Du 281*, которые содержат (GATA)_n-микросателлитный кластер. Эти данные могут свидетельствовать о процессе спонтанного мутагенеза и о начальном этапе внутривидовой дифференциации в природных популяциях этого партеногенетического вида.

Материал и методы. Для ПЦР-анализа использовали образцы ДНК, полученные из крови 26 ящериц *D. dahli* из популяций «Степанаван», «Дилижан», «Шагали», и 6 двуполых ящериц видов *D. mixta* и *D. portschinski*.

ПЦР-анализ проводили на образцах крови ящериц, законсервированной при 4°C в 0,05 M растворе ЭДТА, pH 8, выделяли ядерную ДНК с помощью стандартного фенольно-хлороформного метода с использованием протеиназы К. Подбор праймеров и температурных режимов осуществляли с помощью компьютерной программы PRIMER SELECT ©1993–2000 DNASTAR Inc. Температура отжига 58°C для *Du 281*, 50°C для *Du 215*. В качестве праймеров для монолокусного ПЦР-анализа были использованы пары праймеров для амплификации локусов *Du 281* (AY442143) и *Du 215* (AY574978) [6]. Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 20 мкл в смеси следующего состава: 20 нг ДНК матрицы, 1×амплификационный буфер (Диалат), 25 мМ раствор dATP, 25 мМ раствор dCTP, 25 мМ раствор dGTP, 25 мМ раствор dTTP, 2 мМ MgCl₂; 1 мкМ прямого праймера, 1 мкМ обратного праймера, 0,8 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию проводили на четырехканальном ДНК-амплификаторе ТП4-ПЦР-01 (Терцик) при следующих температурных режимах: денатурация – 3 мин, 94°C; амплификация, 30 циклов (денатурация – 1 мин, 94°C, отжиг – 40 с, $t_{\text{отжига}}$, элонгация – 40 с, 72°C); элонгация – 5 мин, 72°C. После амплификации в смесь добавили 5 мкл смеси бромфенолового синего и ксилентианола. От 5 до 10 мкл продукта фракционировали в 8%-ом нативном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей визуализацией окрашиванием бромистым этидием.

Результаты и обсуждение. Результаты ПЦР-амплификации ДНК особей партеновида *D. dahli* и родительских двуполых видов *D. mixta* и *D. portschinski* представлены на рис. 1, 2. Следует отметить, что по локусу *Du 281* размер продуктов амплификации составляет от 205 до 220 п.н. По локусу *Du 215* все особи *D. dahli* являются гетерозиготами, размер ПЦР-продуктов составляет от 220 до 230 п.н. В данной работе нами обнаружено появление «нового» продукта амплификации размером 195 п.н. (вариант 8). При этом также обнаружено, что популяция «Степанаван» является более гетерогенной по сравнению с двумя другими: по локусу *Du 215* удалось выявить 8 аллельных вариантов. Это может объясняться различными экологическими условиями обитания популяций, приводящими к накоплению мутаций в некодирующей области генома. Популяция «Степанаван» прилегает к зоне Памбак-Севанского тектонического разлома. Известны данные о мутагенном воздействии сейсмически активных зон [7, 8]. ПЦР-продукты гомологичных локусов у родительских видов *D. mixta* и *D. portschinski* имеют примерно ту же электрофоретическую подвижность, что и у *D. dahli*, т.е. распределяются в

электрофоретической зоне от 195 до 240 п.н. Эти данные, полученные пока еще на единичных особях родительских видов, подтверждают гибридное происхождение *D. dahli*. В этом случае не исключаются множественные акты гибридизации, приводящие к появлению клонального разнообразия партеновидов [9]. Возникающие различия между клонами сохраняются благодаря клональному типу наследования и могут усиливаться вследствие мутаций в генетически нестабильных локусах [10].

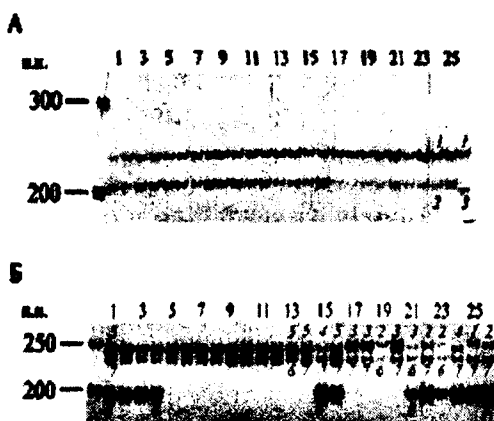


Рис. 1. Электрофорез в 8%-ом нативном ПААГ продуктов амплификации ДНК особей вида *D. dahli*: 1–13 «Дилижан», 14–16 «Шагали», 17–26 «Степанаван». А – *Du 281*, Б – *Du 215*.

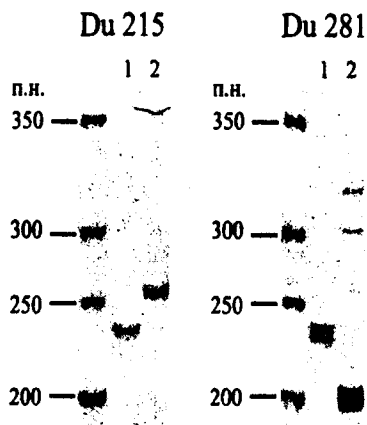


Рис. 2. Электрофорез ПЦР-продуктов в 8%-ом нативном ПААГ. 1 – *D. mixta*; 2 – *D. portschinski*. В качестве маркера молекулярного веса использовали Ladder 50bp «Fermentas» с шагом 50 п.н.

Полученная информация о первичной структуре микросателлитных локусов *Du 215* и *Du 281* позволяет на новом уровне (с использованием монолокусного ПЦР-анализа) изучать внутри- и межпопуляционное разнообразие партеновида *D. dahli*, а также частоту мутаций по этим локусам у потомков первого поколения и последующих генераций. Кроме того, стало возможным проведение сравнительных исследований по данным локусам различных однополых и двуполых видов ящериц.

Кафедра зоологии

Поступила 30.05.2006

ЛИТЕРАТУРА

1. Epplen J.T. – Journal of Heredity, 1988, v. 7, p. 409–417.
2. Darevsky I.S., Kupriyanova L.A., Uzzell T. – Biology of the Reptilia. N.Y.: Wiley, 1985, v. 15, p. 412–526.
3. Даревский И.С. Эволюция и экология партеногенетического размножения у пресмыкающихся. В сб.: Современные проблемы теории эволюции. М.: Наука, 1993, с. 89–109.
4. Murphy R.W., Darevsky I.S., MacCulloch R.D., Fu J., Kupriyanova L.A., Upton D.E., Danielyan F.D. – Genetica, 1997, v. 101, p. 125–130.
5. Давоян А.Г., Асланян А.В., Мартиросян И.А., Даниелян Ф.Д. – Вестник МАНЭБ, Санкт-Петербург, 2006, т. 11, № 8, с. 67–71.
6. Корчагин В.И., Мартиросян И.А., Омельченко А.В., Даревский И.С., Рысков А.П., Токарская О.Н. – Генетика, 2004, т. 40, № 10, с. 1–7.

7. Djrbashian R., Karakhanian A. et al. Natural hazards in the active fault zones of Armenia. The resolution of geological analysis and models for earthquake faulting studies, 1998, p. 41.
8. Moritz C., Uzzel T., Spolsky C., Hotz H., Darevsky I.S., Kupriyanova L.A., Danielyan F.D. – *Genetica*, 1992, v. 87, p. 53-62.
9. Tokarskaya O.N., Kan N.G., Petrosyan V.G. et al. – *Molecular Genetics and Genomics*, 2001, v. 265, p. 812-819.

Ա. Գ. ԴԱՎՈՅԱՆ

Darevskia dahli (ընտ. *Lacertidae*) ԿՈՒՍԱԾԻՆ ՍՈՂԵՄՆԵՐԻ (GATA)_n ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ ԼՈԿՈՒՄՆԵՐԻ ԱԼԵԼԱՅԻՆ ԲԱԶՄԱԶԵԿՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Ամփոփում

Մինի- և միկրոսատելիտային լոկուսների առաջացման խնդիրը, որը լայնորեն ուսումնասիրվում է մարդու և այլ երկսեռ տեսակների կորիզային գենոմում, գործնականորեն ուսումնասիրված չէ կլոնավորմամբ բազմացող տեսակների գենոմում: Կիրառվել է պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (ՊՇՌ-) մեթոդը՝ բացահայտելու (GATA)_n-միկրոսատելիտային կլաստեր պարունակող *D. dahli*-ի *Du 215* և *Du 281* լոկուսների ալելային բազմաձևությունը: Հայտնաբերվել է այդ լոկուսների ներտեսակային և միջտեսակային մեծ փոփոխականություն, որն ավելի արտահայտված է *Du 215* լոկուսում (8 ալելային ձևեր): Երեք ալելային ձևեր են դիտված *Du 281*-ում: *Du 215* և *Du 281* ընտրված պրայմերները օգտագործվել են ենթադրվող ծնողական երկսեռ տեսակների՝ *D. mixta* և *D. portschinski* հոմոլոգ լոկուսների ՊՇՌ-անալիզ կատարելու համար: Ծնողական տեսակների համապատասխան լոկուսները ունեն մոտավորապես նույն չափերը: Այս տվյալները հնարավորություն են տալիս ուսումնասիրել *D. dahli* կուսածին տեսակի գենետիկական փոփոխականությունը:

A. G. DAVOYAN

STUDY OF ALLELIC POLYMORPHISM OF (GATA)_n-CONTAINING LOCI IN THE PARTHENOGENETIC LIZARDS *Darevskia dahli* (*Lacertidae*)

Summary

The genesis of mini- and microsatellite loci, which is under extensive study in humans and some other bisexual species, have been virtually overlooked in clonal mode of reproduction. In present study we use PCR- analysis to examine allelic polymorphism of two loci of *D. dahli* – *Du 215* and *Du 281*- containing (GATA)_n microsatellite cluster. Different levels of intrapopulation and interpopulation variability of these loci were found. *Du 215* showed the highest polymorphism- 8 allelic variants. Three alleles were found for *Du 281*. The primers chosen for loci *Du 215* and *Du 281* were also used for PCR analysis of homologous loci in two presumptive parental bisexual species *D. mixta* and *D. portschinski*. The PCR products of the corresponding loci of the parental species had approximately the same size. These data on the structure of the DNA loci provide a possibility to study genetic diversity in the parthenogenetic species *D. dahli*.