

Некоторые ограничения использования гена *cytb* митохондриальной ДНК как молекулярного маркера для филогенетических и популяционно-генетических исследований на примере рода *Apodemus*

А.Г. Лапинский¹, М.В. Павленко², Л.А. Соловечук¹, В.В. Горбачев¹

¹ Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук, Магадан, Россия;

² Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

Интерпретация сигнала гена *cytb* мтДНК как молекулярного маркера в филогенетических и популяционно-генетических исследованиях может быть осложнена суммарным влиянием параллельных мутаций (энтропией нуклеотидных последовательностей), которые не позволяют в конечном итоге произвести дифференциацию эффектов гибридизации, естественного полиморфизма и артефактов, вносимых псевдогенами. Мы проанализировали возможные ограничения применения гена *cytb* мтДНК в качестве молекулярного маркера на примере некоторых представителей рода *Apodemus*, для чего были рассчитаны значения энтропии нуклеотидных последовательностей и выполнен поиск вероятных трактов генной конверсии для выборок разных видов из изолированного района Тибета, Кореи, юга Приморского края России и Западной Европы. Обнаружено значительное количество гаплотипов, содержащих мотивы, идентифицируемые как тракты генной конверсии. Выявлен высокий уровень изменчивости нуклеотидных последовательностей у видов с Тибетского нагорья, в наибольшей степени – у *A. draco*. Причинами этого явления могут быть влияние низкой эффективной численности на скорость накопления точечных мутаций, а также роль цитохрома b в процессах адаптации к неблагоприятным условиям среды. Рассмотрены эффекты гипервариабельности нуклеотидной последовательности гена *cytb* в некоторых выборках, ведущие к росту энтропии информационного сигнала этого молекулярного маркера, что может имитировать явления генной конверсии при сопоставлении с другими выборками представителей данного рода. Также приведены примеры вероятного присутствия в опубликованных нуклеотидных последовательностях продуктов секвенирования соответствующих псевдогенов. Высказано предположение, что стратегия использования гена *cytb* в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях может различаться в зависимости от степени его вариабельности. Отмечена необходимость тщательного контроля за первичными данными на всех этапах работы с ними.

Ключевые слова: *Apodemus*, мтДНК, *cytb*, генная конверсия, энтропия, псевдоген.

Some limitations in the use of the mitochondrial DNA *cytb* gene as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies by the example of the *Apodemus* genus

A.G. Lapinski¹, M.V. Pavlenko², L.L. Solovenchuk¹, V.V. Gorbachev¹

¹ Institute of the Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the RAS, Magadan, Russia; ² Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the RAS, Vladivostok, Russia

The interpretation of a signal sent by the mtDNA *cytb* gene as a molecular marker in phylogenetic and population genetic research can be complicated by cumulative influence of parallel mutations, i.e., the entropy of nucleotide sequences. Such a phenomenon impedes differentiation among the effects of hybridization, natural polymorphisms, and artifacts imposed by pseudogenes. We analyzed possible limitations in the use of the mtDNA *cytb* gene as a molecular marker by the example of the *Apodemus* genus. For this purpose, the entropy of nucleotide sequences was calculated, and probable tracts of gene conversion were sought in samples of various *Apodemus* species from Tibet, Korea, south of Russian Primorye, and Western Europe. Many haplotypes were identified as containing tracts of gene conversion. The high level of nucleotide sequence variability was found in species from Tibet, particularly, in *A. draco*, presumably due to the influence of low effective sizes of populations on the speed of point mutation accumulation and also cytochrome b role in the adaptation to unfavorable environment. The effects of hypervariability in *cytb* nucleotide sequences of some samplings resulting in entropy growth imitating gene conversion when compared to other species of the genus were analyzed. Examples of possible pseudogene interference among published *cytb* sequences are provided. It is suggested that the strategy in the use of the mtDNA *cytb* gene in population genetics



and phylogenetics should be adapted to the degree of the gene variability. Emphasis is placed on the necessity of close control over sequencing data.

Key words: *Apodemus*, mtDNA, *cytb*, gene conversion, entropy, pseudogene.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Лапинский А.Г., Павленко М.В., Соловечук Л.Л., Горбачев В.В. Некоторые ограничения использования гена *cytb* митохондриальной ДНК как молекулярного маркера для филогенетических и популяционно-генетических исследований на примере рода *Apodemus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(1):128-135. DOI 10.18699/VJ15.016

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Lapinski A.G., Pavlenko M.V., Solovenchuk L.L., Gorbachev V.V. Some limitations in the use of the mitochondrial DNA *cytb* gene as a molecular marker for phylogenetic and population genetic studies by the example of the *Apodemus* genus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):128-135. DOI 10.18699/VJ15.016

Филогеография и построение филогений являются актуальными направлениями в биологии (Avise, 2000). Исследования в этой области, помимо изучения биологического разнообразия, включают поиск молекулярных маркеров и разработку методов, адекватных задачам исследований. К числу часто используемых молекулярных маркеров относятся нуклеотидные последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК). Среди последних ген цитохрома *b* (*cytb*) является, пожалуй, одним из наиболее изученных митохондриальных генов в отношении структуры и функции его белкового продукта (Esposti et al., 1993). Он содержит быстро и медленно мутирующие позиции кодонов так же, как более и менее переменные регионы и целые домены. Поэтому его нуклеотидная последовательность широко используется при изучении разнообразия и в систематике на уровнях от филогенетического (Irwin et al., 1991; Johns, Avise, 1998) до популяционного (см. Rocha-Olivares et al., 1999). В течение длительного времени ген *cytb* рассматривался в качестве едва ли не универсального молекулярного маркера (Avise, Johns, 1999).

Однако за последнее время его применение столкнулось с рядом проблем, таких как неоднозначность нуклеотидного состава, гетерогенность скорости замен у потомков (в различных митохондриях), ведущее к гомоплазии насыщение мутациями в третьей позиции кодонов и ограниченное варьирование замен в первых и вторых позициях, что подчас обуславливает низкую информативность в филогенетических исследованиях высокого ранга и достаточно малое для популяционно-генетических исследований количество информативных сайтов в третьей позиции (Meyer, 1994).

Также опубликованы исследования, указывающие на вероятность интерференции соответствующих псевдогенов при секвенировании гена из-за трудности дифференциации сигналов от обеих последовательностей. Так, были приведены примеры построения ложных филогений, основанных на псевдогене *cytb*, в семействе *Apodemus* (Dubey et al., 2009), как и присутствия псевдогенов митохондриальных генов у некоторых полевок (De Woody et al., 1999) и других грызунов (Smith et al., 1992). Вероятно, число подобных работ будет множиться

в связи с тенденцией появления в базах данных вместо участков мтДНК паралогичных последовательностей ядерного происхождения, не идентифицируемых как таковых (Calvignac et al., 2011).

Другое ограничение, менее изученное до настоящего времени, может заключаться в межвидовой гибридизации, ведущей к генной конверсии митохондриального генома из-за сбоя видоспецифичного механизма элиминации отцовской мтДНК после оплодотворения при межвидовом скрещивании (Kaneda et al., 1995), по крайней мере, в первом поколении (Shitara et al., 1998). Так, была показана генная конверсия участков материнских митохондриальных линий рыжих полевок (*Clethrionomys glareolus*) гомологичными участками мтДНК самцов красной полевки (*Cl. rutilus*) в зоне симпатрии этих видов (Малярчук, 2012). На проблему интрогрессии как присутствия гаплотипов чужого вида в зоне симпатрии указывает и Абрамсон (2007). Достаточно подробно перечисленные особенности маркеров на основе мтДНК проанализированы в обзоре В.В. Гречко (2013).

Сложность интерпретации выявляемого нуклеотидного сигнала осложнена суммарным влиянием параллельных мутаций (энтропией нуклеотидных последовательностей), которые не позволяют в конечном итоге произвести дифференциацию эффектов гибридизации, естественного полиморфизма и артефактов, вносимых псевдогенами. В популяционной генетике информация о количестве и длине трактов генной конверсии является ключевой для определения роли конверсии в генерации гаплотипического разнообразия (Ishii, Charlesworth, 1977; Leslie, Watt, 1986). Для определения вероятной конверсии генов наиболее распространенным является алгоритм, предложенный Betrán с соавт. (1997), использующий относительную частоту нуклеотида в сайте для определения, – является ли сайт информативным в плане конверсии между двумя группами нуклеотидных последовательностей. Сегрегирующий нуклеотид считается информативным, если его относительная частота составляет 20 % и менее в группе «конвертированных» последовательностей и в три или более раз выше в группе «конвертирующих» последовательностей. При этом длину тракта конверсии определяют два край-

них информативных сайта. Следует отметить, что тракты длиной в один нуклеотид не учитываются, поскольку они неотличимы от параллельных мутаций, хотя есть исследователи, придерживающиеся противоположной точки зрения (Bosch et al., 2004). Таким образом, с использованием гена *cytb* в качестве маркера связаны как минимум три группы факторов, энтропия нуклеотидных последовательностей, интерференция псевдогенов и генная конверсия, которые могут затруднять трактовку результатов исследования.

Систематика, филогения и филогеография представителей рода *Apodemus* в Евразии изучалась с привлечением самых разнообразных дифференцирующих критериев, таких как морфологические (Зыков, 2011), цитогенетические (Картавцева, 2002), биохимические (Filippucci et al., 2002), молекулярно-генетические, включая маркеры ядерного (Michaux et al., 2002; Докучаев и др., 2008) и митохондриального геномов. Среди последних ген *cytb* мтДНК используется наиболее часто (см. Michaux et al., 2005; Suzuki et al., 2008; Челомина, Атопкин, 2010; Sakka et al., 2010 и многие другие работы). Интерпретация результатов неоднозначна, что некоторыми авторами связывается с выявлением новых, ранее не описанных видов (Suzuki et al., 2008), хотя нельзя исключать, что несоответствие результатов некоторых исследований связано с особенностями молекулярных маркеров, из которых *cytb* мтДНК использовался в большинстве работ последнего времени.

Цель настоящей работы – проанализировать возможные ограничения применения гена *cytb* мтДНК в качестве молекулярного маркера в филогенетических и популяционно-генетических исследованиях на примере некоторых представителей рода *Apodemus*.

Материалы и методы

Материалом для данного исследования послужили представленные в GenBank нуклеотидные последовательности гена *cytb* мтДНК из выборок некоторых представителей рода *Apodemus* (см. Доп. материалы 1¹): трех довольно изолированных видов китайских эндемиков с юго-восточной оконечности Тибетского нагорья: *A. latronum* (Fan et al., 2011), *A. ilex* (Liu et al., 2012), *A. draco* (Fan et al., 2012). Также были использованы последовательности фрагмента гена *cytb* из выборки *A. agrarius* с юга Приморского края (Переверзева, Павленко, 2014) и двух подвидов *A. agrarius* – корейской полевой мыши *A. agrarius coreae* и островной популяции *A. agrarius chejuensis* (Oh et al., 2013). Чисто европейский вид в настоящей работе представлен выборкой *A. sylvaticus* из Западной Европы (Dubey et al., 2009), в которой приведены последовательности как генов *cytb* мтДНК, так и соответствующих псевдогенов.

Поиск трактов генной конверсии в сравниваемых нуклеотидных последовательностях проводился с использованием программы DnaSP v. 5 (Librado, Rozas, 2009). Для расчета энтропии нуклеотидных последовательностей применялась программа BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) с алгоритмом расчета информационной энтропии (неопределенности) (H_x) по Шеннону (Shannon, 1948) как мерой вариабельности нуклеотида в каждой из позиций выровненных последовательностей по формуле:

$$H_{\text{(нуклеотид)}} = -\sum_i P_i \log_2 P_i,$$

где P_i – частота, с которой i -й нуклеотид встречается в данной позиции (Schneider, Stephens, 1990).

Результаты и обсуждение

При сопоставлении выборок из трех видов, населяющих один и тот же ареал к юго-востоку от Тибета, были получены следующие результаты. Для *A. draco* и *A. ilex* найдено 68 гаплотипов, содержащих тракты, распознающиеся программой DnaSP как результат генной конверсии. Число таких трактов составило 33 между сайтами полной последовательности гена: 1062–1095, 12–1092, 135–699, 231–459, 231–589, 237–699, 243–531, 43–708, 279–813, 285–438, 285–459, 30–1092, 30–327, 369–1092, 396–687, 396–981, 438–708, 522–852, 531–1062, 531–561, 531–636, 531–699, 54–1092, 553–636, 57–396, 588–699, 66–396, 66–522, 699–1008, 699–786, 786–897, 813–981, 831–1033. Их длина варьировала от 30 (между позициями 531 и 561) до 1081 нуклеотида (позиции 12–1092). При этом 5 из 68 гаплотипов принадлежали *A. draco*, а остальные – *A. ilex*.

Количество гаплотипов, содержащих тракты генной конверсии, при сопоставлении выборок *A. latronum* и *A. draco* составило 25 (с длиной трактов от 7 до 40 нуклеотидов, Доп. материалы 2), а между *A. latronum* и *A. ilex* – 11, длина соответствующих трактов составила от 4 до 22 нуклеотидов. Число гаплотипов, которые можно было бы расценивать как конверсию гена *cytb* одного вида другим, примерно одинаково, что не позволяет говорить об ее направленности.

Между выборками *A. agrarius coreae* с юга Корейского полуострова и *A. draco* было обнаружено 12 участков генной конверсии, а для *A. agrarius coreae* и *A. latronum* – всего 3. Такие же результаты были получены при сопоставлении названных выборок с Тибетского нагорья и изолированной выборки *A. agrarius chejuensis* с острова Чеджу, возникшей предположительно вследствие постгляциальной изоляции от *A. agrarius coreae* (Oh et al., 2013).

Между выборками *A. draco* и *A. agrarius* с юга Приморского края было найдено 6 трактов генной конверсии: TTTATTTCTCCATGTAGGACGAGGAATA (279–306) для *A. agrarius* HQ343396 и FJ906768 и СТАТТТТТCCCAGACC (730–745) для *A. draco* HM162824, HM162825, HM162826 и HM162827, тогда

¹ Дополнительные материалы см. в Приложении 4 по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-04/appx4.pdf>

как для выборок *A. latronum* и *A. agrarius* участков конверсии не оказалось.

Неожиданным стало сравнение выборок с Тибетского нагорья с выборкой *A. sylvaticus* из Западной Европы. Если трактовать генной конверсии между последней и *A. latronum* и *A. ilex* не оказалось, то при сравнении с выборкой *A. draco* их было найдено 8.

Мы также определили наличие участков генной конверсии между генами *cytb* и последовательностями соответствующих псевдогенов в выборке *A. sylvaticus* из Западной Европы. Таких трактов обнаружено 3. Нельзя с уверенностью судить, в каком направлении происходит конверсия между последовательностями гена и псевдогена, но очевидно, что этот процесс может оказывать влияние как на филогенетические, так и на популяционно-генетические построения, поскольку предполагается, что мутации в псевдогенах являются селективно нейтральными, в отличие от кодирующих генов мтДНК (Balakirev, Ayala, 2003).

Попарное сопоставление других рассмотренных выборок участков, распознаваемых как тракты, генной конверсии не выявило. Полученные результаты оказались достаточно трудно интерпретируемыми. Если исключительно высокое число эффектов, проявляющихся как генная конверсия, при сопоставлении выборок *A. draco* и *A. ilex* можно было бы трактовать как следствие гибридизации между весьма близкородственными видами из изолированного района симпатрии, то с этой позиции невозможно объяснить наличие одинакового количества гаплотипов, интерпретируемых как результат генной конверсии между выборками *A. draco* и *A. latronum*, с одной стороны, и *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis* – с другой, учитывая островную изоляцию подвида *A. agrarius chejuensis* со времен последнего оледенения. Считать же 8 гаплотипов, обнаруженных при сопоставлении выборок *A. draco* из района, примыкающего с юго-востока к Тибету и *A. sylvaticus* из Западной Европы, как содержащие тракты «генной конверсии», на наш взгляд, абсурдно.

Поэтому мы предположили, что одной из причин найденных различий между изученными выборками представителей рода *Apodemus* были особенности их нуклеотидных последовательностей *reg se*. Для их характеристики была проанализирована информативность сайтов нуклеотидных последовательностей каждой из выборок и построены соответствующие графики энтропии (рисунок, а–е). Как видно из графиков, ее значения высоки практически вдоль всей длины последовательности у *A. draco* (рисунок, а), менее выражены у *A. ilex* (рисунок, б) и *A. latronum* (рисунок, в) и организованы в несколько относительно редких доменов в выборках *A. agrarius* из юга Приморья (рисунок, г), *A. agrarius coreae* с юга Корейского полуострова (рисунок, д) и *A. sylvaticus* из Западной Европы (рисунок, е).

Можно предположить, что вариабельность нуклеотидной последовательности гена *cytb* у *A. draco* (и в меньшей степени у *A. ilex* и *A. latronum*) является следствием большого числа мутаций, накопленных видом, длительно существующим в условиях низкой численности и изоляции (Кимура, 1985; Sanford, 2006). О том, что скорость накопления точечных мутаций зависит от эффективной численности популяции, можно судить и по тому, что нуклеотидные последовательности гена у выборки из широкоареального вида *A. sylvaticus* из Западной Европы обладают наименьшей вырожденностью.

Также высокая вариабельность гена *cytb* у видов с Тибетского нагорья может быть связана с его ролью в обеспечении энергетических процессов при адаптации к неблагоприятным условиям. Так, нулевая гипотеза строгой нейтральности отвергалась с $P < 0,05$ для *A. draco* при 73 %, для *A. ilex* при 52 %, а для *A. latronum* – при 70 % попарных сравнений (codon based Z-test of selection, выполненный в программе Mega5) (Tamura et al., 2011). В этом отношении может показаться справедливым мнение Bosch с соавт. (2004), согласно которому точечные мутации длиной в один нуклеотид могут считаться генными конверсиями, поскольку формально отличить их от гипервариабельных сайтов не представляется возможным. Подтверждением сказанному может служить расчет параметра ψ (Betrán et al., 1997), измеряющего вероятность события конверсии между сравниваемыми выборками на сайт (т. е. вероятность того, что сайт окажется информативным). Значимость этого параметра при сравнении всех выборок с Тибетского нагорья оказалась довольно низкой: $P > 0,05$. Вероятность «ложноположительных» результатов определения трактов конверсии может происходить и из-за реализованного в программе DnaSP условия, при котором вариант нуклеотида в конкретном сайте окажется информативным (Betrán et al., 1997). По этому условию, вероятность возникновения двух независимых параллельных мутаций на одной хромосоме принята $P \leq 0,2^2 = 0,04$. Понятно, что при названных предпосылках программа не сможет дифференцировать тракты генной конверсии от тех, которые возникли в результате параллельных мутаций в высоковариабельном регионе.

Дополнительным свидетельством в пользу того, что причина наблюдаемого эффекта кроется в чрезвычайной изменчивости нуклеотидных последовательностей гена *cytb* в образцах *A. draco*, является ее сравнение с двумя выборками *A. agrarius* – *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis*, давшее одинаковые результаты, несмотря на то что две последние четко различаются популяционно-генетически (Oh et al., 2013). Очевидно, что «генная конверсия» между идентичными трактами у *A. draco* и обоих подвигов *A. agrarius* указывает на то, что она является следствием насыщения мутациями нуклеотидных последовательностей гена *cytb* у *A. draco*. Поэтому не имеет значения, используется ли эта выборка (как

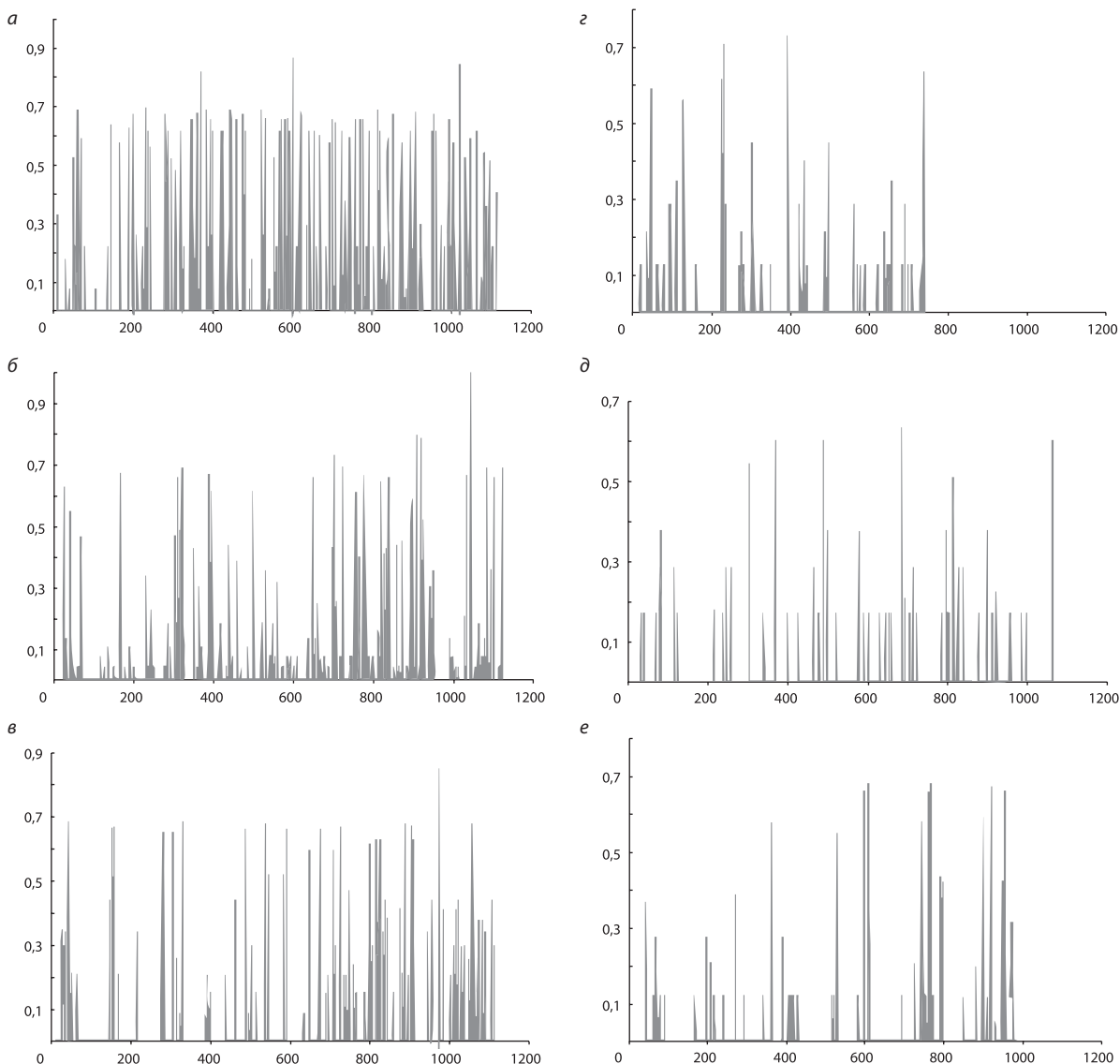


График энтропии нуклеотидной последовательности гена *cytb* в выборке *A. draco* (а), *A. ilex* (б), *A. latronum* (в), *A. agrarius* (Приморье) (г), *A. agrarius coreae* (д), *A. sylvaticus* (е).

По оси абсцисс – позиция нуклеотида в выровненных последовательностях, по оси ординат – Шенноновская энтропия H_x (см. в тексте).

и любая ее часть) в качестве внешней в популяционно-генетическом исследовании или для построения филогений (например, для видов рода *Apodemus* на пространстве Евразии), результаты будут заведомо искажены. Наблюдаемые эффекты можно также приписать гетерогенности скоростей накопления мутаций в митохондриях. Так, нулевая гипотеза гомогенности мутационных скоростей не была отвергнута для *A. agrarius coreae* и *A. agrarius chejuensis*, а также для *A. agrarius* с юга Приморья (в последнем случае рассматривались гаплотипические линии), тогда как для выборок из юго-восточной окраины Тибетского нагорья, как и из Западной Европы, она была отклонена с низкой ($P < 0,05$) значимостью. Такой результат, с одной стороны, можно объяснить влиянием низкой эффективной численности на скорость фиксации

мутации (для видов к юго-востоку от Тибета), с другой – тем, что в выборку *A. sylvaticus* – вида, населяющего широчайший ареал в Европе от побережья Атлантики до востока Украины, попали образцы, пойманные достаточно далеко друг от друга.

Интересным, на наш взгляд, представляется наличие в выборке *A. draco* образца HM162826, имеющего по сравнению с другими наибольшее число трактов генной конверсии при сопоставлении этой выборки с другими (по 4 с *A. latronum* и *A. agrarius coreae* (и, соответственно, с *A. agrarius chejuensis*), 2 – с *A. ilex* и по одной – с *A. agrarius* с юга Приморья и с *A. sylvaticus* из Западной Европы). Кроме того, при сопоставлении нуклеотидных последовательностей митохондриального гена и псевдогена у *A. sylvaticus* из Западной Европы

Фрагменты гена *cytb* у некоторых представителей рода *Apodemus*, гомологичные тракту генной конверсии у *Cl. glareolus* из работы Малярчука (2012)

Мотив	Вид, номер доступа в GenBank
AATACACTATACATCAGAC	<i>Cl. glareolus</i> EU035648
CATACACTACACATCAGAC	<i>A. agrarius</i> AM945850, <i>A. sylvaticus</i> AF548732, <i>A. chejuensis</i> NC 016662, <i>A. chevrieri</i> NC 017599
TATACATTATACATCAGAT	<i>A. latronum</i> AM945831
TATACACTACACTTCAGAT	<i>A. peninsulae</i> AM945781
TATACACTATACATCAGAT	<i>A. latronum</i> AM945819, <i>A. draco</i> HM162767
TATACACTACACATCAGAT	<i>A. latronum</i> AM945808, <i>A. draco</i> HM162790
TATACACTACACGTCAGAT	<i>A. draco</i> HM162788
TATACACTACTCATCAGAT	<i>A. draco</i> HM162798
CAT–CACTACACATCAGAC	<i>A. agrarius</i> AM945770
CAT–C–CTACACATCAGAC	<i>A. agrarius</i> AM945758

Выделены информативные сайты.

все три участка генной конверсии были связаны лишь с одним псевдогеном FJ389582. Очевидно, что наличие подобных вырожденных последовательностей может оказывать влияние как на филогенетические построения, так и на показатели популяционно-генетической изменчивости. Так, значение среднего нуклеотидного разнообразия в выборке *A. draco* без образца HM162826 уменьшалось почти на 3 %. Сходным образом, не оказавшись в выборке *A. sylvaticus* образца FJ389582, результат поиска трактов конверсии оказался бы отрицательным. Все это, на наш взгляд, может диктовать необходимость предварительного изучения исследуемых выборок на гомогенность их нуклеотидных последовательностей.

Иллюстрацией сказанного выше может являться присутствие у некоторых представителей рода *Apodemus* нуклеотидных трактов, гомологичных фрагменту гена *cytb* мтДНК между информативными сайтами 156 и 174 его полной последовательности, который в работе Б.А. Малярчука (2012) был принят за тракт конверсии между гаплотипами *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*. Как видно из таблицы, на этом участке присутствуют весьма разнообразные «мотивы», включающие, помимо информативных сайтов, одну или даже две делеции, что позволяет рассматривать этот фрагмент гена как насыщенный гомоплазиями, причем нельзя исключать и интерференцию продуктов соответствующих псевдогенов, поскольку число делеций, не кратное 3, приведет к сдвигу рамки считывания. Последнее может быть справедливо и для других последовательностей гена *cytb* у *A. agrarius*, таких как AM945854, AM945856 и AM945857, имеющих инсерции из двух аденинов после 178-го нуклеотида или последовательность AM945773, содержащую в этих же позициях цитозин и аденин.

На наш взгляд, информативность данного участка как маркера генной конверсии может оказаться различной, в зависимости от объекта и цели работы, что заставляет относиться к планированию подобных исследований и интерпретации полученных результатов с известной осторожностью. Вероятно, на этом примере мы стал-

киваемся с ситуацией, когда без доступа к первичным материалам (хроматограммы секвенирующих реакций) решить, имеем ли мы дело с паралогизацией митохондриальных генов в ядерном геноме, явлениями интрогрессии и гибридизации или же с высокомутабельным регионом кодирующей последовательности мт генома, весьма затруднительно. На необходимость тщательного изучения хроматограмм реакций секвенирования, помимо упомянутой работы (Dubey et al., 2009), указывает и статья Fietz с соавт. (2013), в которой проведен реанализ собственных данных, депонированных в GenBank, и исходных хроматограмм. Они обнаружили, что около 40 % депонированных гаплотипов содержали ошибки. Хотя этот факт и не привел к изменению сделанных на основании предыдущих данных выводов, авторы заключают, что тщательный контроль необходим на всех этапах – от генерации первичных данных до их интерпретации и депонирования в *on line* депозиториях.

Из сказанного следует, что стратегия использования гена *cytb* в популяционно-генетических и филогенетических исследованиях может оказаться диаметрально противоположной. Например, высокий уровень внутривидовой изменчивости может сделать этот ген ценным маркером в популяционной генетике (например, для изучения пространственной дифференциации популяции *A. draco* к юго-востоку от Тибетского нагорья), но он же может стать фактором, вносящим недопустимый «шум» в филогенетические построения.

Межвидовая гибридизация с последующей генной конверсией в зоне симпатрии разных видов может приводить к парафилии нуклеотидных последовательностей используемого маркера, и этот феномен в ряде случаев будет достаточно трудно отличить как от «энтропийного шума», так и от возможного участия псевдогенов в продуктах секвенирования исследуемых нуклеотидных последовательностей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Абрамсон Н.И. Филогения: итоги, проблемы, перспективы. Информационный вестник ВОГиС. 2007;11(2):307-331.
- Гречко В.В. Проблемы молекулярной филогении на примере отряда чешуйчатых рептилий (отряд Squamata): митохондриальные ДНК маркеры. Молекуляр. биология. 2013;47(1): 61-82.
- Докучаев Н.Е., Лапинский А.Г., Соловечук Л.Л. Генетическая изменчивость полевых мышей (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) Дальнего Востока России по результатам RAPD-PCR анализа. Изв. РАН. Сер. биол. 2008;4:429-434.
- Зыков С.В. Внутривидовая изменчивость и межвидовая дифференциация мышей родов *Apodemus*, *Mus* и *Sylvaemus* Уральского региона по краниальным признакам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург: УГУ им. А.М. Горького, 2011.
- Картавецкая И.В. Карисистематика лесных и полевых мышей (Rodentia, Muridae). Владивосток: Дальнаука, 2002.
- Кимура М. Молекулярная эволюция: теория нейтральности. М.: Мир, 1985.
- Маларчук Б.А. Генная конверсия митохондриального генома при межвидовой гибридизации у полевок рода *Clethrionomys*. Биохимия. 2012;77(5):642-648.
- Переверзева В.В., Павленко М.В. Разнообразие строения гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК полевой мыши *Apodemus agrarius* Pallas, 1771 из популяций юга Дальнего Востока России. Изв. РАН. Сер. биол. 2014;1:5-16.
- Челомина Г.Н., Атопкин Д.М. Молекулярно-генетические свидетельства глубокого филогенетического разрыва между европейской и азиатской расами малой лесной мыши по данным изменчивости гена цитохрома *b* мтДНК. Молекуляр. биология. 2010;44(5):792-803.
- Avice J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. N.Y.: Harvard Univ. Press, 2000.
- Avice J.C., Johns G.C. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification of extant species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999;96:7358-7363.
- Balakirev E.S., Ayala F.J. Pseudogenes: are they «Junk» or functional DNA. Ann. Rev. Genet. 2003;37:123-151.
- Betrán E., Rozas J., Navarro A., Barbadilla A. The estimation of the number and the length distribution of gene conversion tracts from population DNA sequence data. Genetics. 1997;146(1):89-99.
- Bosch E., Hurler M.E., Navarro A., Jobling M.A. Dynamics of a human interparalog gene conversion hotspot. Genome Res. 2004;14:835-844.
- Calvignac S., Konecny L., Malard F., Douady C.J. Preventing the pollution of mitochondrial datasets with nuclear mitochondrial paralogs (numts). Mitochondrion. 2011;11:246-254.
- De Woody J.A., Chesser R.K., Baker R.J. A Translocated mitochondrial cytochrome *b* pseudogene in voles (Rodentia: Microtus). J. Mol. Evol. 1999;48:380-382.
- Dubey S., Michaux J., Brünner H., Hüttermann R., Vogel P. False phylogenies on wood mice due to cryptic cytochrome *b* pseudogene. Mol. Phylogenet. Evol. 2009;50:633-641.
- Esposito D.M., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. Biochim. Biophys. Acta. 1993;1143:243-271.
- Fan Z., Liu S., Liu Y., Zhang X., Yue B. How Quaternary geologic and climatic events in the southeastern margin of the Tibetan Plateau influence the genetic structure of small mammals: inferences from phylogeography of two rodents, *Neodon irene* and *A. latronum*. Genetica. 2011;139(3):339-351.
- Fan Z., Liu S., Liu Y., Lihuan L., Xiuyue Z., Bisong Y. Phylogeography of the South China field mouse (*Apodemus draco*) on the Southeastern Tibetan plateau reveals high genetic diversity and glacial refugia. PLoS ONE. 2012;7(5):e38184. DOI:10.1371/journal.pone.0038184
- Fietz K., Graves J.A., Olsen M.T. Control: a reassessment and comparison of GenBank and chromatogram mtDNA sequence variation in baltic grey seals (*Halichoerus grypus*). PLoS ONE. 2013;8(8):e72853. DOI: 10.1371/journal.pone.0072853
- Filippucci M.G., Macholán M., Michaux J.R. Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia). Biol. J. Linnean Soc. 2002;75(3):395-419.
- Hall T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999;41:95-98.
- Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. J. Mol. Evol. 1991;32:128-144.
- Ishii K., Charlesworth B. Associations between allozyme loci and gene arrangements due to hitch-hiking effects of new inversions. Genet. Res. 1977;30:93-106.
- Johns G.C., Avice J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome *b*. Mol. Biol. Evol. 1998;15:1481-1490.
- Kaneda H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya C., Lindahl K.F., Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intra-specific crosses during early mouse embryogenesis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1995;92:4542-4546.
- Leslie J.F., Watt W.B. Some evolutionary consequences of the molecular recombination process. Trends Genet. 1986;2:288-291.
- Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25: 1451-1452.
- Liu Q., Chen P., He K., Kilpatrick C.W., Liu S.Y., Yu F.H., Jiang X.L. Phylogeographic Study of *Apodemus ilex* (Rodentia: Muridae) in Southwest China. PLoS ONE. 2012;7(2):e31453.
- Meyer A. Shortcomings of the cytochrome *b* gene as a molecular marker. Trends Ecol. Evol. 1994;9:278-280.
- Michaux J.R., Chevret P., Filippucci M.G., Macholán M. Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis to the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA. Mol. Phylogenet. Evol. 2002;23:123-136.
- Michaux J.R., Libois R., Filippucci M.-G. So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. Heredity. 2005;94:52-63.
- Oh D.J., Kim T.W., Chang M.H., Han S.H., Oh H.S., Kim S.J. Migration route estimation of the Jeju striped field mouse *Apodemus agrarius chejuensis* (Rodentia, Muridae). Mitochondrial DNA. 2013;24:137-144.
- Rocha-Olivares A., Rosenblatt R.H., Vetter R.D. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (Sebastes, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome *b* and control region sequences. Mol. Phyl. Evol. 1999;11(3):441-458.
- Sakka H., Quéré J.-P., Kartavtseva I., Pavlenko M., Chelomina G., Atopkin D., Bogdanov A., Michaux J. Comparative phylogeography of four *Apodemus* species (Mammalia: Rodentia) in the Asian Far East: evidence of Quaternary climatic changes in their genetic structure. Biol. J. Linn. Soc. 2010;100(4):797-821.

- Sanford J.C. Genetic Entropy and the Mystery of the Genome. N.Y.: Elim, Elim Publ., 2006.
- Schneider T.D., Stephens R.M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucl. Acids Res. 1990;18:6097-6100.
- Shannon C.E. A mathematical theory of communication. Bell Syst. Tech. J. 1948;27:379-423.
- Shitara H., Hayashi J.I., Takahama S., Kaneda H., Yonekawa H. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. Genetics. 1998;148(2):851-857.
- Smith M.F., Thomas W.K., Patton J.L. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. Mol. Biol. Evol. 1992;9(2):204-215.
- Suzuki H., Filippucci M.G., Chelomina G.N., Sato J.J., Serizawa K., Nevo E. Biogeographic view of *Apodemus* in Asia and Europe inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. Biochem. Genet. 2008;46:329-346.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011;28:2731-2739.