ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ЧАСТОТЫ ИНВЕРСИОННЫХ РАЗРЫВОВ В ГЕНОМАХ ВИДОВ *CHIRONOMUS* (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

А.Д. Брошков^{1, 2}, Л.А. Мирошниченко³, И.И. Кикнадзе¹, В.Д. Гусев³

 ¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: broshkov@gmail.com;
²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;
³Учреждение Российской академии наук Институт математики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Проведена оценка локализации и частот инверсионных разрывов в геномах 115 видов рода *Chironomus* из двух цитокомплексов (pseudothummi и thummi), отличающихся наличием реципрокных транслокаций целых плеч в двух хромосомах (**AE** CD **BF** G и **AB** CD **EF** G соответственно). Определены частоты и общее количество инверсионных разрывов, накопленных в геномах видов этих цитокомплексов за всю историю их цитогенетической эволюции. Всего выявлено 288 точек инверсионных разрывов: 55 в плече A, 34 в плече E, 61 в плече F, 55 в плече C, 83 в плече D. Выявлены четыре категории точек разрывов по частоте их встречаемости: 1) 15 точек с максимальной частотой, отражающих локализацию границ наиболее древних космополитных инверсий; 2) многочисленные общие для обоих цитокомплексов точки разрывов; 3) специфические для каждого из цитокомплексов точки разрывов; 4) консервативные участки, в которых не выявляются инверсионные разрывы. Показано, что различные комбинации хромосомных плеч в двух транслоцированных хромосомах влияют на распределение точек инверсионных разрывов во всем геноме.

Ключевые слова: *Chironomus*, политенные хромосомы, последовательности дисков, инверсионные разрывы, хромосомная эволюция.

Введение

Итоги сравнительной геномики животных, основывавшейся на молекулярном анализе геномов и протеомов, свидетельствуют о том, что дивергенция геномов в процессе видообразования происходит в основном за счет хромосомных перестроек, менявших порядок генов в группах сцепления. Оказалось, что геномы таких эволюционно далеких видов, как человек, мышь, дрозофила, малярийный комар, различаются прежде всего молекулярными инверсиями, дупликациями, перемещением и др., а не числом и спектром генов (Kumar et al., 2001; Zdobnov et al., 2002; Marques-Bonet et al., 2004; Severson et al., 2004; Ayala, Coluzzi, 2005; Bhutkar et al., 2008; Kirkpatrick, 2010). Сходные заключения были сделаны и цитогенетиками, изучающими хромосомную эволюцию (Dobzhansky, 1970; White, 1977; King, 1993; Eichler, Sankoff, 2003; Кiknadze *et al.*, 2003, 2008; Navarro, Barton, 2003; Severson *et al.*, 2004; Гундерина и др., 2005в). Ими было продемонстрировано, что дивергенция кариотипов животных обусловлена такими перестройками, как пара- и перицентрические инверсии, изменяющие порядки генов. Визуально изменение порядка генов в хромосомах при видообразовании можно проследить у видов двукрылых насекомых, обладающих политенными хромосомами с четкими последовательностями дисков, специфическими для каждого вида (Bridges, 1935; Muller, 1936; Beermann, 1972). Эти диски могут быть использованы как структурные маркеры порядков генов в хромосомах двукрылых насекомых.

Ранее мы провели сравнительный анализ последовательностей дисков политенных хромосом у видов рода *Chironomus* и оценили степень их видовой дивергенции на основании определения числа инверсионных точек разры-

вов (Kiknadze *et al.*, 2003, 2008). Для этого был специально модифицирован разработанный нами метод попарного сравнения последовательностей дисков (Гусев и др., 2001; Kiknadze *et al.*, 2003). На основании оценки числа точек инверсионных разрывов в кариотипах хирономид были построены филогенетические деревья и реконструирована хромосомная эволюция рода *Chironomus* (Kiknadze *et al.*, 2003; Гундерина и др., 2005а, 6; Кикнадзе и др., 2007).

Поскольку эволюция кариотипов в роде Chironomus была связана прежде всего с реципрокными транслокациями целых хромосомных плеч, было важно выяснить, влияет ли объединение разных плеч (групп сцепления генов) в одну хромосому на процесс хромосомных перестроек (частоту разрывов и точки разрывов) в эволюции. Для этой цели в данной работе было проведено детальное сравнение инверсионных разрывов в двух крупнейших цитокомплексах pseudothummi и thummi. Эти цитокомплексы различаются разной комбинацией хромосомных плеч (рис. 1). В цитокомплексе pseudothummi комбинация плеч AE CD **BF** G, тогда как в цитокомплексе thummi она другая – **AB** CD **EF** G.

В настоящей работе проведена оценка локализации и частот инверсионных разрывов по длине пяти хромосомных плеч в геноме видов *Chironomus* из двух цитокомплексов (pseudothummi и thummi). Были определены частоты и общее количество инверсионных разрывов, накопленных в геномах видов за всю историю их цитогенетической эволюции. Также были оценены размеры консервативных участков, в которых не выявляются инверсионные разрывы.

Материалы и методы

Для анализа использовались последовательности дисков политенных хромосом 54 видов рода *Chironomus* из цитокомплекса pseudothummi и 61 вида из цитокомплекса thummi (табл. 1). Последовательности хромосом остальных видов взяты нами из работ других исследователей (Martin, 1971; Wulker *et al.*, 1989; Шобанов, Зотов, 2001).

Необходимо отметить, что к настоящему времени удалось получить сведения о последовательностях дисков у одних видов только для 3 хромосомных плеч (A, E, F), у других – для 5 хромосомных плеч (A, C, D, E, F). Для компьютерного анализа в данной работе были использованы лишь основные видоспецифические последовательности дисков для каждого вида, так как эти последовательности сформированы фиксированными в эволюции инверсиями (Kiknadze *et al.*, 2003, 2004; Кикнадзе и др., 2007). Альтернативные, редкие и уникальные последовательности не были включены в анализ, поскольку они чаще всего встречаются в гетерозиготе и являются флуктуирующими.

В работе использован быстрый метод выявления взаимосвязей в подборках функционально и/или эволюционно близких биологических тестов (Гусев и др., 2001; Kiknadze *et al.*, 2003).

Результаты

Анализ локализации и частот инверсионных разрывов лучше всего рассматривать на примере каждого из изученных хромосомных плеч.

Плечо А. Выявлено 55 сайтов локализации точек инверсионных разрывов (рис. 2). Среди них четко выявляются по максимальной частоте (около 90 %) 4 сайта. Частоты разрывов в этих сайтах практически одинаковы в обоих цитокомплексах. Указанные сайты выявляются как точки разрывов в космополитных базовых последовательностях дисков, наиболее древних в роде *Chironomus*, обнаруженных ранее на 4–5 континентах (Кикнадзе и др., 2007).

Помимо того, встречаются сайты инверсионных точек разрывов, одинаковые для обоих цитокомплексов, но различающиеся по частоте.

Кроме того, важно отметить, что в плече А найдены сайты, специфические либо для



Рис. 1. Транслокационные различия в цитокомплекcax pseudothummi и thummi (по: Keyl, 1962).

Таблица 1

Цитокомплекс pseudothummi	Цитокомплекс thummi
C. acidophilus, C. alluaudi, C. analis, C. anonymus,	C. aberratus, C. acutiventris, C. agilis, C. agilis2,
C. aprilinus, C. australis, C. calipterus, C. cloacalis,	C. albimaculatus, C. annularius, C. anthracinus,
C. circumdatus, C. crassiforceps, C. crassimanus,	C. sp. AppleValley, C. arcustylus, C. atrella,
C. sp. CA3, C. sp. CoyoteCreek, C. dorsalis,	C. behningi, C. beljaninae, C. bifurcatus,
C. duplex, C. februaris, C. forsythi, C. sp. Gali,	C. blaylocki, C. bonus, C. borokensis, C. cingulatus,
C. holomelas, C. incertipenis, C. jacksoni, C. luridus,	C. commutatus, C. crassicaudatus, C. cucini,
C. sp.LasBrisas, C. maddeni, C. melanescence,	C. entis, C. esai, C. fraternus, C. frequentatus,
C. sp. MeerenbergA, C. sp. MeerenbergB,	C. fundatus, C. harpi, C. heterodentatus,
C. nepeanensis, C. sp. NZ1, C. sp. NZ5,	C. heteropilicornis, C. hyperboreus, C. sp. Is,
C. sp. NZ6, C. sp. NZ8, C. occidentalis,	C. jonmartini, C. sp. J, C. longistylus, C. sp. Le,
C. oppositus, C. pankratovae, C. plumatisetigerus,	C. melanotus, C. mozleyi, C. muratensis, C. nigrifrons,
C. pseudooppositus, C. pseudothummi,	C. novosibiricus, C. nuditarsis, C. nudiventris,
C. sp. RiodeJaneiroA, C. sp. RiodeJaneiroB,	C. obtusidens, C. pilicornis, C. piger, C. plumosus,
C. samoensis, C. saxatilis, C. striatipennis,	C. riihimakiensis, C. riparius, C. salinarius, C. sinicus,
C. sp. SS, C. tepperi, C. timmsi, C. transvaalensis,	C. sokolovae, C. sororius, C. staegeri, C. stigmaterus,
C. uliginosus, C. uliginosus2, C. yoshimatsui,	C. suwai, C. tenuistylus, C. trabicola, C. tuvanicus,
C. sp. VillaPaz, C. sp. WOC, C. sp. X, C. zealandicus	C. utahensis, C. whitseli, C. sp. W, C. winnelli

Список исследованных видов рода *Chironomus**

Выделены виды, последовательности которых изучены в секторе эволюционной геномики хирономид ИЦиГ СО РАН.



Рис. 2. Локализация и частоты разрывов в плече А.

цитокомплекса pseudothummi, либо для цитокомплекса thummi. Причем частота таких точек разрывов варьирует от умеренной (30 %) до низкой (2 %), их можно рассматривать как уникальные для цитокомплексов районы.

Участки, не затронутые инверсионными разрывами (консервативные районы) в плече А, довольно малы: разрывы распределены равномерно по хромосоме, при этом остаются свободными от 2 до 4 дисков. Единственными областями, почти не затронутыми инверсиями, являются районы 18 и 19. В цитокомплексе pseudothummi на границе 18-го и 19-го районов находится одна точка разрыва с малой частотой, а в цитокомплексе thummi на границе 17-го и 18-го районов обнаружены две точки разрыва.

Плечо Е. Для плеча Е выявлены 34 сайта локализации точек инверсионных разрывов (рис. 3). Характерной особенностью этого плеча является наличие только двух космополитных базовых точек разрывов с максимальной частотой в обоих цитокомплексах (3е-f и 10b-c). Кроме того, имеется один сайт в районе 4h-5a, где максимальная частота обнаружена только в цитокомплексе thummi (85 %), в цитокомплексе pseudothummi частота разрывов едва достигает



Рис. 3. Локализация и частоты разрывов в плече Е.

20 %. Остальные точки инверсионных разрывов встречаются с очень малой частотой.

Общими для обоих цитокомплексов являются 9 точек инверсионных разрывов, они незначительно различаются по частоте между цитокомплексами и, как уже говорилось, встречаются с очень малой частотой.

Специфическими для цитокомплекса pseudothummi являются 11 сайтов инверсионных разрывов, для цитокомплекса thummi также найдено 11 сайтов.

Консервативные районы в плече Е малы (2–4 диска), за исключением в центральной части плеча и в районе 13 у центромеры.

Плечо F. В данном плече найден 61 сайт локализации точек инверсионных разрывов (рис. 4). Из них наибольший интерес представляют три района: 10d–11a – район разрыва, встречающегося в базовой последовательности с максимальной частотой в обоих цитокомплексах, 2a–b – район с максимальной частотой для цитокомплекса pseudothummi и 17d–18a – район с максимальной частотой для цитокомплекса thummi. В этом плече присутствуют общие точки разрывов, одинаковые для обоих цитокомплексов, но различающиеся по частоте.

Кроме того, встречается и несколько специфических для каждого из цитокомплексов точек инверсионных разрывов: 15 для цитокомплекса pseudothummi и 26 для цитокомплекса thummi. Консервативные участки плеча в основном малы (2–4 диска), но в отличие от остальных плеч в плече F есть большой участок, не затронутый инверсионными разрывами, – прицетромерный район 20с–23f.

Плечо С. Так же, как и в других плечах, точки инверсионных разрывов равномерно распределены по всей длине плеча С (рис. 5). Насчитывается 55 сайтов локализации инверсионных разрывов. Базовыми точками с максимальной частотой в обоих цитокомплексах являются три сайта в районах 6h–7a, 15e–16a, 17a–b. Кроме того, для цитокомплекса thummi выявлены дополнительные сайты с максимальной частотой разрывов 6b–c, 6f–g, 7d–8a, 11с–d. В цитокомплексе pseudothummi в этих районах также встречены разрывы, но с гораздо меньшей частотой.

Так же, как и для других плеч, в плече С присутствуют точки разрывов, одинаковые для обоих цитокомплексов, однако они очень сильно различаются по частоте.

Специфическими для каждого из цитокомплексов точками являются 10 сайтов для цитокомплекса pseudothummi и 30 сайтов для цитокомплекса thummi.

В данном плече участки, не затронутые инверсиями, также малы (2–5 дисков), исключение – прицентромерный район 19–22 с единичными сайтами разрывов.



Плечо D. Для данного плеча характерно наибольшее число сайтов локализации точек инверсионных разрывов – 83 (рис. 6). Особенностью данного плеча можно назвать отсутствие базовых точек с максимальной частотой, идентичной в обоих цитокомплексах. Однако в каждом из цитокомплексов найдены сайты с довольно высокой частотой встречаемости: 2h–3a для цитокомплекса pseudothummi и 3g–4a, 7g–8a, 10e–11a, 18de для цитокомплекса thummi.

Так же, как и в плече С, в данном плече сходные точки разрывов очень отличаются по частоте у разных цитокомплексов.

Сайты 2h–3а и 18d–е являются специфическими для цитокомплексов pseudothummi и thummi соответственно. В общей сложности найден 21 сайт локализации уникальных точек разрывов для цитокомплекса pseudothummi и 37 сайтов, характерных только для цитокомплекса thummi.

Для плеча D характерно отсутствие целых районов плеча без точек инверсионных разрывов, консервативные участки малы (2–4 диска).

Обсуждение

Анализ локализации и частот инверсионных разрывов у 115 видов рода *Chironomus* показал, что общая картина хромосомных разрывов в процессе видообразования оказывается в основном сходной во всех изученных хромосомных плечах (A, E, F, C и D).

Многочисленные сайты инверсионных разрывов, накопленные за всю цитогенетическую историю цитокомплексов, были обнаружены во всех изученных хромосомных плечах. Они распределены практически по всей длине плеч.

В каждом из плеч четко выявляются несколько сайтов (2–4) с максимальной частотой разрывов (70–90 %). Их локализация идентична у обоих цитокомплексов. Нами было выявлено, что данные точки разрывов являются границами инверсий в космополитных базовых последовательностях дисков в роде *Chironomus*. Данные последовательности – наиболее примитивные, древние, они встречаются на 4–5 континентах во всех плечах (Кикнадзе и др., 2007).

Точки разрывов с меньшей частотой встречаются в базовых последовательностях, найденных на 2–3 континентах. Обнаруженные нами разрывы с малой частотой являются границами инверсий в последовательностях, встречающихся на отдельных континентах.

Консервативные участки, как правило, очень малы (2–4 диска). Исключение составляют лишь прицентромерные районы плеч, где плотность разрывов мала, а консервативные участки крупнее (до 20 дисков).

Кроме вышесказанного, в ходе анализа были установлены и различия между отдельными плечами (табл. 2). Наиболее изменчивым оказалось плечо D, наименее – плечо E. Различными оказались число и частота базовых точек разрывов. Наиболее четко общая картина локализации и частот выражена в плечах A, E и F, наименее четко это прослеживается в плечах C и D. Последнее связано с тем, что эти плечи очень изменчивы, особенно плечо D. Немаловажно и то, что плечи C и D изучены у меньшего числа видов.

Несмотря на то что основное число точек инверсионных разрывов является сходным в гомологичных плечах обоих цитокомплексов, в них обнаруживаются и четкие различия по локализации и частотам отдельных точек (табл. 2). Во-первых, обнаружено различное количество космополитных точек разрывов в изученных цитокомплексах. Во-вторых, выявлено наличие большого числа специфических для каждого из цитокомплексов точек разрывов, что свидетельствует о разных путях дивергенции этих цитокомплексов после их разделения. В-третьих, в изученных цитокомплексах наибольшие различия затрагивают плечи А, Е и F, что связано с тем, что эти плечи участвуют в реципрокных транслокациях. Однако наличие подобных специфичных различий в плечах С и D (не вовлеченных в транслокационные изменения) говорит о влиянии сочетания различных плеч на распределение точек инверсионных разрывов во всем геноме.

Полученные нами результаты вполне согласуются с имеющимися в литературе данными о высокой частоте точек инверсионных разрывов в геномах большинства изученных видов. Конечно, молекулярный анализ позволяет обнаружить значительно большее число инвертированных участков в геномах, чем цитогенетический анализ (Kirkpatrick, 2010), однако оба подхода представляют взаимодополняющий материал



для развития инверсионной геномики. Сочетание обоих подходов было продемонстрировано при анализе инверсионных перестроек у 12 видов *Drosophila* (Bhutkar, 2008), показавшем, что изучение инверсий позволяет достаточно точно восстановить цитогенетическую историю видов.

Литература

- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г. и др. Дивергенция последовательностей дисков политенных хромосом как отражение эволюционных преобразований линейной структуры генома // Генетика. 2005а. Т. 41. № 2. С. 187–195.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г. и др. Особенности дивергенции последовательностей дисков в разных плечах политенных хромосом отражают относительную независимость эволюции отдельных компонентов генома // Генетика. 2005б. Т. 41. № 4. С. 549–558.
- Гундерина Л.И., Кикнадзе И.И., Истомина А.Г., Голыгина В.В. Изменчивость и дивергенция мультилокусных маркеров генома у видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) // Генетика. 2005в. Т. 41. № 12. С. 1634–1643.
- Гусев В.Д., Немытикова Л.А., Чужанова Н.А. Быстрый метод выявления взаимосвязей в подборках функционально и/или эволюционно близких биологических тестов // Молекуляр. биология. 2001. Т. 35. С. 1015–1022.
- Кикнадзе И.И., Гундерина Л.И., Батлер М.Дж. и др. Хромосомы и континенты // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 322–352.
- Кикнадзе И.И., Гундерина Л.И., Истомина А.Г. и др. Реконструкция хромосомной эволюции в роде *Chironomus* // Евразиат. энтомол. журнал. 2004. Т. 3. С. 265–273.
- Шобанов Н.А., Зотов С.Д. Цитогенетические аспекты филогении рода *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae) // Энтомол. обозрение. 2001. Т. 80. С. 180–193.
- Ayala F.J., Coluzzi M. Chromosome speciation: human, Drosophila and mosquitoes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. P. 6535–6542.
- Beermann W. Chromosomes and genes // Results and Problems in Cell Differentiation. 1972. V. 4. P. 1–33.
- Bhutkar A., Schaeffer S.W., Russo S.M. *et al.* Chromosomal rearrangement inferred from comparisons of 12 Drosophila genomes // Genetics. 2008. V. 179. P. 1657–1680.
- Bridges C.B. Salivary gland chromosome maps, with key to the banding of chromosomes of *Drosophila melanogaster* // J. Heredity. 1935. V. 26. P. 60–64.

- Eichler E., Sankoff D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution // Science. 2003. V. 301. P. 793–797.
- Keyl H.-G. Chromosomenevolution bei *Chironomus*. II. Chromosomenbauten und Phylogenetische Beziehungen der Arten // Chromosoma. 1962. Bd. 13. S. 464–514.
- Kiknadze I.I., Gunderina L.I., Butler M.G. et al. Chromosomes and Continents // Biosphere Origin and Evolution / Eds N. Dobretsov, N. Kolchanov, A Rozanov, G. Zavarzin. Springer, 2008. P. 349–369.
- Kiknadze I.I. Gunderina L.I., Istomina A.G. *et al.* Similarity analysis of inversion banding sequences of Chironomus species (breakpoint phylogeny) // Bioinformatics of genome regulation and structure / Eds N. Kolchanov, R. Hofestaedt. Kluwer Acad. Press, 2003. P. 245–253.
- King M. Species Evolution: The Role of Chromosome Change. N.Y., 1993. 336 p.
- Kirkpatrick M. How and why chromosome inversions evolve // PLoS Biol. 2010. V. 8. (9). P. 1–5.
- Kumar S., Tamura K., Kakobsen I.B., Nei M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Tempe, Arizone, USA: Arizona State Univ., 2001.
- Marques-Bonet T., Caceres M., Bertranpetit A. *et al.* Chromosomal rearrangements and the genomic distribution of gene-expression divergence in humans an chimpanzees // Trends Genet. 2004. V. 20. P. 524–529.
- Martin J. A review of genus Chironomus (Dipters, Chironomidae). IY. The karyosystematics of australis group in Australia // Chromosoma. 1971. V. 35. P. 418–430.
- Muller H.J. Bar duplication // Science. 1936. V. 83. P. 528–530.
- Navarro A., Barton N.H. Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation // Evolution. 2003. V. 57. P. 447–459.
- Severson D.W., de Bruyn B., Lovin D.D. et al. Comparative genome analysis of the yellow fever mosquito *Aedes aegupti* with *Drosophila melanogaster* and malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* // J. Heredity. 2004. V. 95. P. 103–113.
- White M.J. Animal Cytology and Evolution. L.; N.Y.; Malburn: Cambridge Univ. Press, 1977. 961 p.
- Wulker W., Sublette J.E., Morath E., Martin J. *Chironomus columbiensis* n. sp. in South America and *C. anonymus* Williston in North America – Closely related species // Stud. Neotr. Fauna and Environment. 1989. V. 24. P. 121–136.
- Zdobnov E.M., von Mering C., Lutenic I. *et al.* Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* // Science. 2002. V. 298. P. 149–159.

LOCATIONS AND FREQUENCY OF INVERSION BREAKPOINTS IN CHIRONOMUS GENOMES (DIPTERA, CHIRONOMIDAE)

A.D. Broshkov^{1, 2}, L.A. Miroshnichenko³, I.I. Kiknadze¹, V.D. Gusev³

 ¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: broshkov@gmail.com;
² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;
³ Institute of Mathematics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

The locations and frequency of inversion breaks were analyzed in the genomes of 115 *Chironomus* species of two cytocomplexes (pseudothummi and thummi), differing in reciprocal translocations of whole chromosome arms in two chromosomes (**AE** CD **BF** G and **AB** CD **EF** G, respectively). The frequencies and total number of inversion breaks accumulated in the genomes of these cytocomplex in the history of their cytogenetic evolution were determined. A total of 288 inversion breakpoints were found: 55 on arm A, 34 on arm E, 61 on arm F, 55 on arm C, 83 on arm D. Four types of inversion breakpoints were identified by their frequencies: 1) 15 points with a maximum frequency, reflecting the locations of boundaries of the oldest cosmopolitan inversions; 2) numerous breakpoints common to both cytocomplexes; 3) breakpoints specific for each of cytocomplex; and 4) conservative sites, where inversion breakpoints were not detected. It is shown that various combinations of chromosome arms in the two translocated chromosomes affect the distribution of breakpoints and the frequency of inversion breaks throughout the genome.

Key words: *Chironomus*, polytene chromosomes, banding sequences, inversion breakpoints, chromosomal evolution.