

КАРИОТИП И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ 24-ХРОМОСОМНОЙ ФОРМЫ СЕРОГО ХОМЯЧКА *NOTHOCRICETULUS MIGRATORIUS* ИЗ ТЯНЬ-ШАНЯ

© 2024 г. О. В. Брандлер¹ *, А. В. Блехман¹

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия
*e-mail: rusmarmot@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.12.2023 г.

После доработки 12.01.2024 г.

Принята к публикации 16.01.2024 г.

Серый хомячок *Nothocricetulus migratorius*, являясь широкоареальным палеарктическим видом грызунов, обладает кариотипом со стабильным числом хромосом $2n = 22$ на всей территории обитания. Нами найдены серые хомячки с диплоидным числом хромосом $2n = 24$, локально распространенные на Кураминском хребте Тянь-Шаня. Впервые дано описание нового кариотипа и анализ G и NORs – дифференциально окрашенных хромосомных наборов. От 22-хромосомного кариотипа серых хомячков описываемый кариотип отличается морфологией Y-хромосомы и наличием дополнительной пары гетероморфных мелких хромосом. Молекулярно-генетический анализ выявил генетическую дивергенцию 24- и 22-хромосомных форм *N. migratorius*, различия между которыми по митохондриальным маркерам сопоставимы, а по ядерным превышают различия между *Cricetulus barabensis* ($2n = 20$) и *C. psevdogriseus* ($2n = 24$). Полученные нами данные позволяют обсуждать таксономический статус 24-хромосомной формы серых хомячков с Кураминского хребта и рассматривать дифференциацию кариоморф *N. migratorius* как этап хромосомного видообразования.

Ключевые слова: серый хомячок, кариотип, молекулярно-генетическая изменчивость, хромосомное видообразование.

DOI: 10.31857/S0016675824070102 **EDN:** BGWVSN

Серый хомячок *Nothocricetulus migratorius* Pallas, 1773 имеет один из самых больших ареалов среди грызунов Старого Света, занимающий территорию от Восточных Балкан на западе до Центрального Китая и Монголии на востоке и от Волжско-Камского междуречья на севере до Ирана, Афганистана и Пакистана на юге [1–3]. Обитает в равнинной и горной степи. Обладает широкой морфологической изменчивостью, что нашло отражение в описании более полутора десятков подвидов [1], которые образуют две группы – западную *phaeus* и восточную *migratorius* [2], которые также поддерживаются молекулярно-генетическими данными [4]. В отличие от морфологических и молекулярно-генетических признаков кариотип *N. migratorius*, изученный в разных частях ареала, стабилен и имеет $2n = 22$, $NF = 44$ (Nombre Fundamentale) [5–7]. В связи с этим было неожиданным обнаружение нами серых хомячков в Тянь-Шане с отличающимся кариотипом [8]. В настоящей работе мы впервые описываем характеристики нового кариотипа с использованием дифференциальных окрасок хромосом и оцениваем молекулярно-генетические

отличия и филогенетические связи данной хромосомной формы в пределах вида *N. migratorius* и с рядом других видов хомячков рода *Cricetulus*.

Были исследованы хромосомные наборы трех самцов серых хомячков с Ангренского плато, расположенного на Кураминском хребте Тянь-Шаня (41.20° с. ш., 70.62° в. д.), отловленных нами в 1995 г. Для получения хромосомных препаратов использована стандартная методика, обычно применяющаяся при работе с мелкими млекопитающими [9]. Для G-окрашивания хромосом применялся метод, предложенный М. Сибрайтом [10]. Дифференциальное окрашивание ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом выполнено по методу окраски Ag-NOR У. Хоуэла и Д. Блэка [11].

Для оценки филогенетических связей тянь-шаньских хомячков с другими представителями *Cricetulus* был проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ этих животных с тремя особями *N. migratorius* из разных частей ареала (Семипалатинской обл. Казахстана, Монголии и Украины), а также с представителями двух

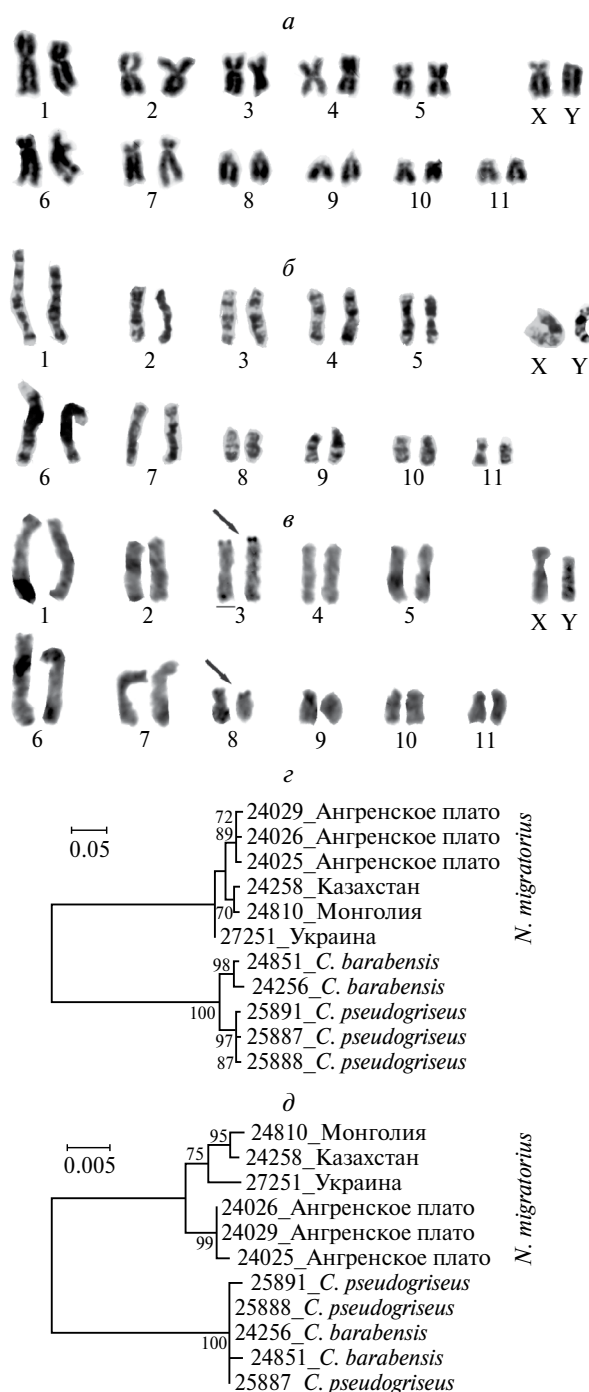


Рис. 1. Кариотип самца серого хомячка *N. migratorius* $2n = 24$. *a* – рутинная окраска, *б* – G-окраска, *в* – Ag-NOR-окраска. Стрелками указано положение ЯОР, подчеркнута хромосома с ЯОР на обоих плечах. Кладограммы объединенных нуклеотидных последовательностей хомячков по результатам анализа ML: *z* – мтДНК (*cytb* и *COI*), *д* – яДНК (*BGN* и *C-myc*). Цифры в наименовании ветвей соответствуют регистрационным номерам образцов в КТЖ ИБР. Цифрами у узлов обозначены индексы бутстрэп-поддержки.

других видов хомячков – барабинского *Cricetulus barabensis* Pallas, 1770 (две особи из аймака Ховсгел Монголии и Павлодарской области Казахстана) и забайкальского *C. pseudogriseus* Orlov and Iskhakova, 1975 (три особи из аймака Дорнод Монголии). Материалом для данного исследования послужили образцы тканей хомячков, хранящихся в УНУ “Коллекция тканей диких животных для генетических исследований” при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (КТЖ ИБР, рег. номер 3579666).

Геномную ДНК выделяли солевым методом [12]. Для анализа использовали последовательности двух митохондриальных молекулярно-генетических маркеров: ген цитохрома *b* (*cytb*) – 1140 пн и фрагмент первой единицы гена цитохромоксидазы (*COI*) – 662 пн, а также два ядерных маркера: фрагмент гена *BGN* – 750 пн и фрагмент гена *C-myc* – 685 пн. Реакции амплификации проводили с опубликованными ранее парами праймеров в соответствии с предложенными для них протоколами: *cytb* – L14727-SP и H15915-SP [13]; *COI* – L5310 и R6036R [14]; *BGN* – BGN-f и BGN-r [15]; *C-myc* – S92-F и S91-R [16]. ПЦР проводили в конечном объеме 25 мкл, содержащем 30–50 нг тотальной ДНК, 0.2 mM dNTP, 4 pmol каждого праймера, ПЦР буфер в однократной финальной концентрации и 1 единицу HS-Тақ ДНК полимеразы (Евроген, Россия) на термоциклере АВ Veriti 96 well TC (Applied Biosystems). Результаты ПЦР оценивались электрофорезом 2 мкл реакционной смеси в 1.5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Для очистки продукта ПЦР использовались наборы для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standart (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Реакцию секвенирования проводили в 10 мкл реакционной смеси с теми же праймерами, что и в реакциях амплификации, с использованием набора BigDye v.3.1 (“Applied Biosystems”, США) по протоколам производителя. Полученные фрагменты анализировали в ЦКП ИБР РАН на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3500 (“Applied Biosystems”).

Корректировку хроматограмм проводили с помощью программы SeqMan пакета Lasergene 11 (DNASTAR, США). Неоднозначно расшифрованные позиции редактировали вручную. Последовательности по всем четырем маркерам выравнивались независимо с помощью алгоритма MUSCLE [17] в пакете программ MEGA X [18]. Все вновь полученные последовательности депонированы в GenBank NCBI с номерами доступа: PP457730–PP457740, PP481634–PP481644, PP477416–PP477426, PP477427–PP477437. Выравненные фрагменты генов каждого образца были объединены в суммарные последовательности мтДНК (1802

пн) и яДНК (1435 пн). Выбор наилучших моделей эволюции объединенных нуклеотидных последовательностей для анализа по методу максимального правдоподобия (ML) выполнен в программе MEGA X на основе байесовского информационного критерия (BIC). Филогенетический анализ (ML) проводили в программе MEGA X с использованием НКУ+G модели нуклеотидной эволюции для объединенных последовательностей мтДНК и Kimura 2-параметрической модели для объединенных последовательностей яДНК. Генетические различия оценивались по попарным дистанциям (p -distance, d_p). Устойчивость узлов филогенетических деревьев оценивали, применяя бутстрэп-анализ по 1000 репликам.

Исследованные кариотипы трех самцов серого хомячка с Ангрнского плато не отличаются друг от друга. Все три особи имеют $2n = 24$, $NF = 46$. Аутосомы представлены пятью парами крупных и средних мета- и субметацентриков, составляющих постепенно убывающий по величине ряд; двумя парами крупных субтелоцентриков; тремя парами мелких субмета- субтелоцентриков и одной самой мелкой гетероморфной парой набора, состоящей из субметацентрика и акроцентрика. X-хромосома – средней величины субметацентрик; Y-хромосома – акроцентрик, практически равный по длине X-хромосоме (рис. 1, а–в). Данный кариотип отличается от ранее описанного для *N. migratorius* [5 и др.] наличием дополнительной самой мелкой гетероморфной пары аутосом и морфологией Y-хромосомы, которая у всех других серых хомячков субметацентрическая. При сравнении G-окрашенного хромосом 24- и 22-хромосомных кариотипов *N. migratorius* [19] прослеживается парная гомология аутосом, за исключением 11-й пары. Степень детализации G-бэндов полученных препаратов также не позволила идентифицировать возможные гомологичные 11-й паре участки в 22-хромосомном кариотипе с более детальной G-окраской [20]. В то же время элементы 11-й пары проявляют сходство с коротким плечом субметацентрической Y-хромосомы *N. migratorius*.

Предположение о возможности происхождения крупных Y-хромосом у хомячков в результате слияния с аутосомами дискутируется длительное время [21, 22], однако прямых доказательств таких хромосомных перестроек до настоящего времени не получено. Образование неополовой хромосомы путем слияния предковой Y-хромосомы и аутосомы обнаружено у рыб с множественной системой половых хромосом [23]. Вопрос, имели ли место подобные перестройки в эволюции половых хромосом у хомячков, требует дальнейшего изучения.

В 24-хромосомном наборе гетероморфная 11-я пара состоит из двуплечей и одноплечей хромосом. Ранее описанный для хомячков из Армении [5] и Таджикистана [7] гетероморфизм по величине

двуплечих хромосом одной из мелких мета-, субметацентрических пар (№ 8) связывался с изменчивостью гетерохроматинового материала. Гомологичная пара (№ 8) в 24-хромосомном кариотипе является субметацентрической и изоморфной (рис. 1, а).

Ag-NOR-окраска стабильно выявляла ЯОР на 3-й и 8-й парах аутосом (рис. 1, в). На гомологах этих хромосом в 22-хромосомном кариотипе обнаружена аналогичная локализация ЯОР [22]. В той же работе ЯОР обнаружены еще на двух парах хромосом, на гомологах которых в описываемом нами кариотипе ЯОР проявлялись нестабильно, что может быть связано с недостаточно высоким качеством препаратов.

Результаты филогенетического анализа, представленные на кладограммах (рис. 1, з, д), показывают сходные результаты по митохондриальным (з) и ядерным (д) маркерам. Все последовательности образуют две клады, одна из которых включает всех *N. migratorius*, а вторая объединяет *C. barabensis* и *C. pseudogriseus*. При этом все три хомячка с описанным нами кариотипом ($2n = 24$) с Ангрнского плато образуют компактные кластеры с высокой бутстрэп-поддержкой внутри клад *N. migratorius*. Митохондриальные последовательности *C. barabensis* и *C. pseudogriseus*, имеющих разные кариотипы $2n = 20$ и $2n = 24$ соответственно [24], также образуют отдельные видовые кластеры с высокой бутстрэп-поддержкой внутри общей клады, но последовательности яДНК этих видов объединены в единый слабо дифференцированный кластер. Генетические различия по мтДНК между хромосомными формами *N. migratorius* в два раза ниже ($d_p = 0.02$ по *cytb*), чем между *C. barabensis* и *C. pseudogriseus* ($d_p = 0.04$). При этом различия по ядерным маркерам *N. migratorius* с разными кариотипами на порядок выше ($d_p = 0.01$), чем между *C. barabensis* и *C. pseudogriseus* ($d_p = 0.001$).

В проведенных ранее молекулярно-генетических исследованиях *N. migratorius*, в которых использовались образцы двух из трех хомячков с Ангрнского плато, эта форма образовывала отдельную филетическую линию с базальным расположением на дереве [4]. Среди других видов Cricetidae только *C. longicaudatus* и *C. pseudogriseus* имеют $2n = 24$ [25], и лишь у последнего Y-хромосома является относительно мелким акроцентриком, что рассматривается как архаичный признак для хомячков [26] и для Muroidea в целом [25]. Можно предположить, что серые хомячки из западного Тянь-Шаня являются предковой формой для всех остальных *N. migratorius*, 22-хромосомный кариотип которых произошел от описываемого 24-хромосомного набора.

Место находки 24-хромосомных хомячков расположено в пределах распространения группы

подвидов *coerulescens* [4]. Однако отсутствие морфологического материала от кариотипированных особей не позволяет отнести хомячков Кураминского хребта к какой-либо из центральноазиатских морфологических групп. Тем не менее полученные данные позволяют обсуждать таксономический статус 24-хромосомной формы серых хомячков с Кураминского хребта и рассматривать дифференциацию *N. migratorius* как пример хромосомного видообразования [27].

Работа финансировалась из средств Договора НИР № 261 от 08.11.2021, выполняемого в рамках проекта № 075-15-2021-1069 от 28.09.2021 г. ФНТП развития генетических технологий на 2019 – 2027 г. (II очередь. Биоресурсные коллекции) Минобрнауки России.

Исследование одобрено Этическим комитетом ИБР РАН им. Н.К. Кольцова, протокол № 70 от 25.05.2023 г.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громов И.М., Ербаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: Наука. 1995. 522 с.
2. Лебедев В.С. *Cricetinae* – Млекопитающие России. Систематико-географический справочник // Сб. тр. Зоол. музея МГУ. Т. 52 / под ред. Павлинов И.Я., Лисовский А.А. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2012. С. 211–220.
3. Lebedev V.S., Bannikova A.A., Neumann K. et al. Molecular phylogenetics and taxonomy of dwarf hamsters *Cricetulus* Milne-Edwards, 1867 (*Cricetidae*, Rodentia): Description of a new genus and reinstatement of another // *Zootaxa*. 2018. V. 4387. P. 331–349. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4387.2.5>
4. Lebedev V., Poplavskaya N., Bannikova A. et al. Genetic differentiation in *Cricetulus migratorius* Pallas, 1773 (Rodentia, *Cricetidae*) // *Mammalian Biology*. 2018. V. 92. P. 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2018.05.001>
5. Yerganian G., Papoyan S. Isomorphic sex chromosomes, autosomal heteromorphism, and telomeric associations in the grey hamster of Armenia, *Cricetulus migratorius*, Pall. // *Hereditas*. 1965. V. 52. № 3. P. 307–319. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1965.tb01963.x>
6. Гайченко В.А. Хромосомный набор серого хомячка с территории Украины // *Вестник зоологии*. 1974. № 2. С. 79–80.
7. Картавцева И.В. Внутривидовой хромосомный полиморфизм широкоареальных видов: краснохвостой песчанки и серого хомячка // *Фенетика популяций*. Саратов: 1985. С. 84–85.
8. Брандлер О.В. Новая хромосомная форма серого хомячка *Cricetulus migratorius* Pallas, 1773 из Тянь-Шаня // VI съезд Териологического об-ва. Москва, 13–16 апреля 1999. Тез. докл. М.: 1999. С. 37.
9. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes // *Stain Technol.* 1956. V. 31. № 6. P. 247–251.
10. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // *Lancet*. 1971. V. 11. P. 971–972.
11. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus: A 1-step method // *Experientia*. 1980. V. 36. P. 1014–1015.
12. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucl. Ac. Res.* 1997. V. 25 (22). <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
13. Jaarola M., Searle J.B. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences // *Mol. Ecol.* 2002. V. 11. P. 2613–2621. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01639.x>
14. Nakamura I., Ohnuma A., Ichihashi T. Mus musculus mitochondrial COI gene for cytochrome c oxidase subunit I, partial cds. 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/193248428>, дата обращения 30.11.2023 г.
15. Lyons L.A., Laughlin T.F., Copeland N.G. et al. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes // *Nature Genetics*. 1997. V. 15. № 1. P. 47–56.
16. Steppan S.J., Storz B.L., Hoffmann R.S. Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from *c-myc* and *RAG1* // *Mol. Phylog. and Evol.* 2004. V. 30. № 3. P. 703–719. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00204-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00204-5)
17. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Ac. Res.* 2004. V. 32 № 5. P. 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
18. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. *MEGA X: Molecular evolutionary enetics nalysis* across computing platforms // *Mol. Biol. and Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
19. Lavappa K.S. Chromosome banding patterns and idiogram of the Armenian hamster, *Cricetulus migratorius* // *Cytologia*. 1977. V. 42. № 1. P. 65–72.
20. Radjabli S.I., Sablina O.V., Graphodatsky A.S. Selected karyotypes // *Atlas of Mammalian Karyotypes* / Eds O'Brien S.J., Nash W.G., Menninger J.C. Chichester: John Wiley, 2006. P. 209–221.

21. Matthey R. Cytologie comparee des Cricetinae paelearctiques et americains // Rev. Suisse Zool. 1961. V. 68. P. 41–61.
22. Ахвердян М.Р. Особенности поведения половых хромосом в мейозе у серого хомячка (*Cricetulus migratorius* Pallas, 1770) // Генетика. 1993. Т. 29. № 6. С. 950–959.
23. Kitano J., Peichel C.L. Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes // Environ. Biol. of Fishes. 2012. V. 94. P. 549–558. <https://doi.org/10.1007/s10641-011-9853-8>
24. Poplavskaya N., Bannikova A., Neumann K. et al. Phylogeographic structure in the chromosomally polymorphic rodent *Cricetulus barabensis* sensu lato (Mammalia, Cricetidae) // J. Zool. Syst. and Evol. Res. 2019. V. 57. № 3. P. 679–694. <https://doi.org/10.1111/jzs.12251>
25. Romanenko S.A., Volobouev V.T., Perelman P.L. et al. Karyotype evolution and phylogenetic relationships of hamsters (Cricetidae, Muroidea, Rodentia) inferred from chromosomal painting and banding comparison // Chromosome Research. 2007. V. 15. P. 283–298. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1124-3>
26. Орлов В.Н., Исхакова Э.Н. Таксономия надвида *Cricetulus barabensis* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журн. 1975. Т. 54. В. 4. С. 597–604.
27. Воронцов Н.Н. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: И-во Отдел УНЦ ДО МГУ. Прогресс-Традиция, АБФ. 1999. 640 с.

Karyotype and Molecular Genetic Differentiation of a 24-Chromosomal form of the Gray Hamster *Nothocricetulus migratorius* from the Tien Shan

O. V. Brandler^{1,*}, A. V. Blekhan¹

¹Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: rusmarmot@yandex.ru

The widespread Palaearctic rodent species gray hamster *Nothocricetulus migratorius* has a karyotype with a stable number of chromosomes $2n = 22$ throughout the entire range of its habitat. We found gray hamsters with diploid number of chromosomes $2n = 24$ locally distributed in the Qurama Ridge of the Tyan Shan. A new karyotype and analysis of G- and NORs-bands of differentially stained chromosome sets were described for the first time. The described karyotype differs from the 22-chromosomal karyotype of gray hamsters by the Y-chromosome morphology and the presence of an additional pair of heteromorphic small chromosomes. Molecular genetic analysis revealed genetic divergence of 24- and 22-chromosomal forms of *N. migratorius*, and the differences between them in mitochondrial markers are comparable, and in nuclear markers exceed the differences between *C. barabensis* ($2n = 20$) and *C. psevdogriseus* ($2n = 24$). The data obtained give grounds to discuss the taxonomic status of the 24-chromosomal form of gray hamsters from the Qurama Ridge and consider the differentiation of *N. migratorius* karyomorphs as a stage of chromosomal speciation.

Keywords: gray hamster, karyotype, molecular genetic variability, chromosomal speciation.