

На правах рукописи

УДК 577.21:598.112

Бадаева Татьяна Николаевна

**Изучение структурной организации и полиморфизма
микросателлитных локусов у партеногенетической ящерицы
Darevskia unisexualis.**

Специальность 03.00.26 – «молекулярная генетика»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2008

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН, лаборатории организации генома

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор,

член-корреспондент РАН

Рысков А.П.

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Крамеров Д.А.

Доктор биологических наук, профессор

Сулимова Г.Е.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится “22” октября 2008 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва В-334, ул. Вавилова 32.

Автореферат разослан “22” сентября 2008 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Партеногенетические позвоночные благодаря особенностям системы размножения образуют линии генетически идентичных животных и поэтому являются уникальными модельными организмами для экологических, эволюционных и молекулярно-генетических исследований. В частности, они могут быть использованы для изучения генетической нестабильности гипервариабельных ДНК, причин и механизмов, приводящих к ее появлению. Для большинства однополых позвоночных установлено, что они возникают в результате межвидовой гибридизации, изменяющей цитологические механизмы репродукции [Dawley, 1989; Vrijenhoek, 1994]. Их популяции состоят из самок, размножающихся клонально. Даули [Dawley, 1989] сформулировал две наиболее важные проблемы в исследовании клональных видов позвоночных: (1) выяснение цитологических механизмов клонального размножения и (2) определение причин внутри и межпопуляционного клонального разнообразия.

Кавказские скальные ящерицы рода *Darevskia* представлены в Закавказье и соседних районах Турции 18 бисексуальными и 7 партеногенетическими видами. Все партеногенетические виды этого рода имеют гибридное происхождение, характеризуются диплоидным набором хромосом, невысоким уровнем гетерозиготности аллозимных локусов [Fu *et al.*, 1998] и незначительной вариабельностью сайтов рестрикции митохондриальной ДНК [Moritz *et al.*, 1992]. Проведенные ранее ДНК-фингерпринтные исследования ящериц рода *Darevskia* выявили значительный уровень популяционной неоднородности особей по отдельным микросателлитным маркерам ДНК [Кан *и др.*, 1998; Токарская *и др.*, 2000].

Популяционное разнообразие однополых видов принято объяснять мутациями, множественным гибридным происхождением и возможной незаконной рекомбинацией [Parker and Selander, 1976; Parker, 1979; Cole *et al.*, 1988; Moritz *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 2000]. Однако степень влияния каждого из этих факторов на уровень генетической вариабельности остается неясным. Более того, практически нет данных о природе мутаций и их вкладе в геномное и клональное разнообразие однополых позвоночных. Наиболее простой путь для выявления мутационной составляющей - это прямое изучение мутационных событий в родословных, например при сравнении геномов матери и потомков. ДНК-фингерпринтный анализ семей партеногенетических ящериц показал, что в геноме *D. unisexualis* и *D. armeniaca* существуют нестабильные локусы,

изменчивость в которых приводит к разнообразию ДНК-фингерпринтных фенотипов у потомков и в популяциях [Токарская и др., 2003, Malysheva et al., 2007]. Однако что лежит в основе наблюдаемых изменений – мутации в сайтах рестрикции, изменение длины микросателлитного кластера или мутации в участках ДНК, прилежащих к микросателлитному кластеру, остается неясным. Поэтому необходимо проведение молекулярно-генетических исследований индивидуальных микросателлитсодержащих локусов в популяционных и семейных образцах ДНК, что позволит определить структуру аллельных вариантов локусов, молекулярную природу и механизмы возникновения микросателлитных мутаций у клонально размножающихся животных.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение структурной организации и полиморфизма микросателлитных локусов генома, поиск и характеристика мутаций по этим локусам у партеногенетических ящериц *Darevskia unisexualis* и *D. armeniaca*, а также у ряда двуполых видов рода *Darevskia*. Для выполнения этой работы были поставлены следующие задачи:

1. Выделение и характеристика рекомбинантных клонов, содержащих (GATA)_n, (TCC)_n и (TCT)_n микросателлиты, из геномной библиотеки *D.unisexualis*.
2. Молекулярно-генетический анализ микросателлитсодержащих локусов у *D.unisexualis* и двуполых родительских видов *D. (raddei) nairensis* и *D.valentini*.
3. Поиск и характеристика *de-novo* мутаций полиморфных локусов на больших выборках семейных образцов *D.unisexualis* и *D. armeniaca*.
4. Молекулярно-генетическая характеристика и сравнительный анализ переменных микросателлитсодержащих локусов у ряда представителей двуполых видов рода *Darevskia*.

Научная новизна работы. Впервые показано существование супернестабильного микросателлитного локуса, содержащего (GATA)_n, в геноме клонально размножающихся ящериц *D. unisexualis*. Впервые выявлена и определена молекулярная структура мутантных аллелей супернестабильного локуса у партеногенетических потомков первого поколения *D. unisexualis*. Тем самым получены прямые свидетельства о вкладе и характере мутационных событий в геномное и клональное разнообразие однополых популяций позвоночных. Впервые на молекулярном уровне получены данные о межвидовой изменчивости ряда микросателлитных локусов у однополых и двуполых ящериц рода *Darevskia*.

Практическое значение работы. Полученные результаты важны для понимания факторов, определяющих геномное и клональное разнообразие однополых популяций. Работа вносит важный вклад в современные представления о геномной нестабильности и характере мутационной изменчивости микросателлитных локусов у клональных видов позвоночных. В практическом отношении важны данные о молекулярной структуре индивидуальных локусов в исследованных геномах однополых и двуполых ящериц, которые могут быть использованы для целей геномного маркирования, определения филогенетических связей, реконструкции эволюционных событий у представителей рода *Darevskia*. Кроме того, эти данные могут быть использованы в курсах лекций по молекулярной генетике и эволюционной биологии для студентов биологических специальностей высших учебных заведений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: International conference «The Biology of Genomes» (Cold Spring Harbor USA, 2007), 14th European Congress of Herpetology (Porto Portugal, 2007), XVII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2005), International conference «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution» (Yerevan Armenia, 2005), 9th evolutionary meeting at Marseilles (Marseille France, 2005).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ из них 6 статей и 8 тезисов докладов и материалов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 126 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов, списка литературы (218 источников) и раздела благодарностей. Работа включает 3 таблицы и 47 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Изучение структурной организации и полиморфизма микросателлит-содержащих локусов у *D. unisexualis* и двуполых родительских видов *D. (raddei) nairensis* и *D. valentini*.

1.1 Получение и молекулярная характеристика рекомбинантных клонов партеновида *D. unisexualis*, содержащих микросателлитные кластеры.

В работе была использована ранее созданная геномная клонотека партеновида *D. unisexualis* [Корчагин и др., 2004a,b]. Из нее были отобрано 3

клона, содержащие (GATA)-последовательность, 1 клон – (TCT) и 1 клон – (TCC)-последовательность. Клоны были секвенированы, к ним подобраны специфичные пары праймеров для выявления аллельных вариантов с помощью ПЦР.

1.2 Анализ популяций *D. unisexualis* по локусам *Du47*, *Du418*, *Du161*, *Du222* и *Du334*.

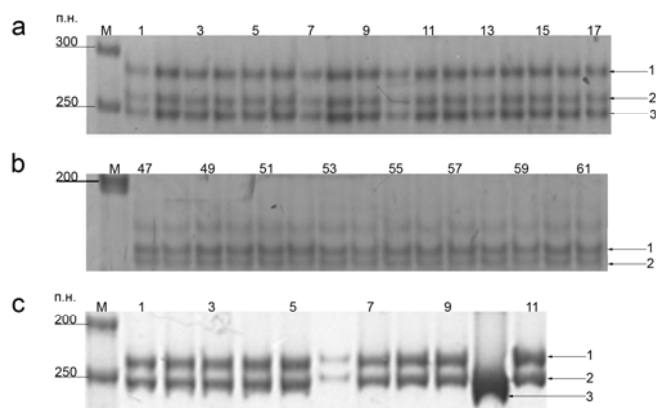


Рисунок 1. Электрофорез в ПААГ ПЦР - продуктов локусов *Du418* (а) *Du47* (b) и *Du161* (с) особей *D. unisexualis* из разных популяций. Стрелками обозначены аллельные варианты. Маркеры молекулярного веса 100 bp+ Ladder "Fermentas" с 100 п.н.

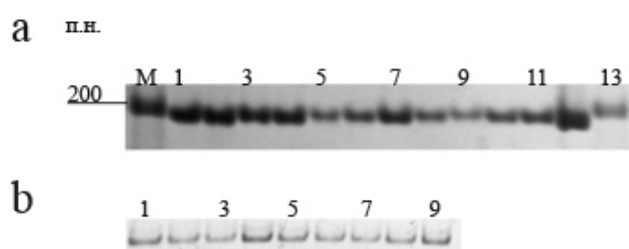


Рисунок 2. Электрофорез в 8%-ном ПААГ ПЦР-продуктов локусов *Du334* (а) и *Du222* (b) различных популяций *D. unisexualis*. Маркеры молекулярного веса 50 bp Ladder "Fermentas" с шагом 50 п.н.

физм этих локусов в популяциях двуполых родительских видов.

1.3 Анализ внутри- и межпопуляционного полиморфизма локусов *Du47*, *Du418* и *Du161* у двуполых родительских видов *D. (raddei) nairensis* и *D. valentini*.

В связи с тем, что *D. unisexualis* (как и другие партеновиды рода *Darevskia*) имеет гибридное происхождение, нами были исследованы локусы, ортологичные *Du47*, *Du418* и *Du161*, у родительских видов *D. valentini* и *D. (raddei) nairensis*. Следует отметить, что ПЦР-продукты ортологичных локусов имеют примерно те же электрофоретические подвижности, что и у *D. unisexualis*, однако, они

Всего было изучено 68 особей из различных популяций. ПЦР анализ показал, что (GATA) содержащие локусы представлены электрофоретически (ЭФ) различающимися аллелями (**рисунок 1**).

Локусы, содержащие TCT и TCC, представлены только одним ПЦР продуктом (**рисунок 2**). Практически все исследованные особи не вариабельны, только по локусу *Du161* найдена одна отличная от других особь. Таким образом, все исследованные локусы оказались мономорфны в исследованных популяционных выборках, а три из них (*Du47*, *Du418* и *Du161*) представлены ЭФ-различающимися аллелями. Затем был изучен аллельный полимор-

варианты *D. valentini* отличаются от двух аллелей *D. unisexualis* длиной и составом микросателлитного кластера, а также транзициями и делециями во фланкирующих областях.



Рисунок 6. Нуклеотидные последовательности аллельных вариантов локуса *Du47* *D. unisexualis* в сравнении с двуполовыми видами *D. raddei* и *D. (raddei) nairensis*. Однуклеотидные замены во фланкирующих последовательностях ДНК у двух аллелей *D. unisexualis* отмечены серым цветом. Микросателлитный кластер выделен рамкой. Верхняя строка – консенсусная последовательность

Секвенирование ПЦР-продуктов подтвердило существование только одного аллельного варианта локуса *Du47* в *D. (raddei) nairensis* (Рис. 6). Аллельные варианты особей *D. raddei* и *D. (raddei) nairensis* идентичны между собой и по последовательности соответствуют второму аллельному варианту локуса *Du47* у *D. unisexualis*.

2. Выявление и молекулярная характеристика *de-novo* мутаций в (GATA)_n содержащих локусах партеногенетических потомков *D.unisexualis*.

Известно, что наиболее прямой и адекватный способ выявления мутаций – это сравнительный анализ генома или индивидуальных локусов у родителей и потомков в семейном анализе. Мы использовали две выборки семейных образцов партеновидов *D. unisexualis* (49 семей, 168 потомков F₁) и *D. armeniaca* (50 семей, 147 потомков F₁). Среди всех изученных в нашей лаборатории микросателлитных локусов *D. unisexualis* большинство (в т.ч. охарактеризованные в этой работе) были мономорфными. Только два (GATA)_n-содержащих локуса - *Du281* и *Du215*, оказались полиморфными [Корчагин 2004а,б; Korchagin et al., 2007]. В настоящей работе проводился поиск мутаций по этим локусам у потомков семей *D. unisexualis* и *D. armeniaca*.

2.1 Монолокусный PCR-анализ анализ локусов *Du281* и *Du215* на панели семейных образцов *D. armeniaca*.

Первая серия экспериментов была выполнена совместно с к.б.н. Малышевой Д.Н. (Институт биологии гена РАН). Ни в одной из 50 семей *D. armeniaca* не было обнаружено мутаций по исследуемым локусам.

2.2 Монолокусный PCR-анализ локусов *Du281* и *Du215* на панели семейных образцов *D.unisexualis*.

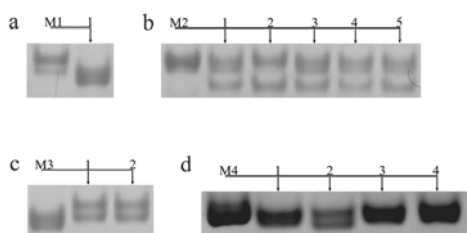


Рисунок 7. Внутрисемейная ЭФ-вариабельность ПЦР-продуктов локуса *Du281*. а–d – семьи 1–4. Материнские ДНК обозначены М1–М4 соответственно; ДНК потомков показаны стрелками и пронумерованы в каждой семье.

Аналогичный анализ семейных образцов *D. unisexualis* по *Du215* также не выявил внутрисемейных вариаций в подвижности ПЦР-амплификантов. В то же время по локусу *Du281* у потомков четырех семей были обнаружены мутации. На **рис. 7** представлены результаты ПЦР-анализа этих семей. Таким образом, частота мутаций по локусу *Du281* у *D.unisexualis* равна $1,428 \times 10^{-1}$ событий на зародышевую ткань, что на несколько порядков превышает среднюю частоту мутаций микросателлитных локусов. Прямое подтверждение мутантной природы аллелей, а также определение характера мутаций может быть получено с помощью их клонирования и секвенирования.

2.3 Молекулярная характеристика мутантных аллелей у потомков *D. unisexualis*.

Сравнение нуклеотидных последовательностей локуса *Du281* в материнских особях и их потомках выявило мутации только в микросателлитном кластере, мутации во фланкирующих районах обнаружены не были (**Рис. 8-9**). Материнские аллели и соответствующие им аллели потомков определялись по гаплотипам Т-А-Т и С-Г-С, образованным фиксированными мутациями в прилежащих к микросателлиту областях каждого аллеля локуса *Du281* [Korchagin et al. 2007].

В семье 1, состоящей из материнской особи и одного потомка, была обнаружена делеция одного GATA-мономера в обеих аллелях потомка (**Рис. 8А**). В семье 2, состоящей из материнской особи и пяти потомков, только в одной аллели, несущей гаплотип С-Г-С, у всех потомков произошла одинаковая мутация – делеция GATATA в микросателлитном кластере (**Рис. 8В**), а вторая аллель осталась неизменной. В семье 3, состоящей из матери и двух потомков, произошла инсерция одного GATA-мономера в микросателлитном кластере обеих аллелей потомков (**Рис. 8С**).

В четвертой семье, состоящей из матери и четырех потомков, несколько различных мутаций обнаружены в аллели, несущей гаплотип С-Г-С (**Рис. 9**).



Рисунок 9. Нуклеотидные последовательности аллелей локуса *Du281* в семейных образцах ДНК *D. unisexualis* (семья 4). Мутации выделены серым цветом. Однуклеотидные замены, образующие гаплотипы, обведены прямоугольником. Микросателлит содержащий кластер выделен рамкой.

В семьях доминировали изменения на одно повторяющееся звено. В двух семьях (все потомки семьи 2 и потомок #2, семьи 4) материнский аллель и аллель потомка отличались друг от друга делецией ГАТАТА-последовательности. Мутации могут происходить в двух или только в одной аллели. В двух семьях мутации были одинаковыми у всех потомков одной семьи, а в четвертой паттерны мутаций у потомков отличались.

3. Сравнительный анализ (GATA)_n- содержащих локусов *Du281* и *Du47* у различных двуполовых видов рода *Darevskia*.

Мутационную изменчивость у микросателлитов можно изучать, сравнивая аллели ортологичных микросателлитных локусов у родственных видов. Этот подход дает возможность оценить исторически накопленные мутации, однако он не позволяет определить последовательность и характер мутационных событий.

С помощью локус-специфического ПЦР-анализа с парами праймеров, подобранные для локусов *Du281* и *Du47*, проводилось изучение аллельного полиморфизма ортологичных локусов у различных двуполовых видов рода *Darevskia*. Были выявлены аллельные варианты этих локусов и определены их различия на уровне первичной структуры ДНК.

3.1. Полиморфизм двуполовых видов рода *Darevskia* по локусу *Du281*.

Локус *Du281* высоко полиморфен, среди исследованных особей *D. raddei* он представлен как минимум шестью аллельными вариантами, различающимися по

электрофоретической подвижности продуктов амплификации в пределах 50 нуклеотидных пар. У представителей *D. portschinski portschinski* locus представлен четырьмя аллельными вариантами. Среди исследованных особей *D. portschinski nigrita* было выявлено три аллельных варианта. У *D. caucasica* и *D. driada* он представлен двумя аллелями, а *D. dagestanica* и *D. chlorogaster* одной.

3.2. Полиморфизм двуполых видов рода *Darevskia* по локусу *Du47*.

Исследованные особи *D. raddei* были гомозиготны по локусу *Du47*, и в исследованных выборках он представлен одним аллельным вариантом. У представителей *D. portschinski portschinski*, наоборот, он оказался высоко полиморфным. Большинство исследованных особей гетерозиготны, а locus представлен пятью аллельными вариантами. В выборке *D. portschinski* также выявлено пять аллельных вариантов, причем ПЦР-продукты локуса *Du47* у особей обоих подвидов значительно отличались. *D. dagestanica*, *D. caucasica* и *D. driada* были гомозиготами по изучаемому локусу, а *D. chlorogaster* гетерозиготой.

3.3. Секвенирование аллельных вариантов локуса *Du281* у ряда представителей двуполых видов рода *Darevskia*.

Было проведено секвенирование ПЦР-продуктов представителей нескольких видов с последующим компьютерным анализом данных. Ранее были исследованы аллельные варианты ортологов *Du281* двуполых родительских видов [Korchagin et al., 2007] и было показано, что аллельные варианты с гаплотипом – Т-А-Т перешли от *D. (raddei) nairensis*, а с гаплотипом С-Г-С - от *D. valentini*. Как и у *D. unisexualis*, у родительских видов аллельные варианты различались по длине и структуре микросателлитного кластера. При рассмотрении структуры самих микросателлитных кластеров у всех изученных видов была обнаружена короткая последовательность из несовершенных мономеров (GATATA или GATGATATA), четко фиксированная около 3'- конца кластера. Причем оказалось, что последовательность GATATA ассоциирована с гаплотипом С-Г-С, а последовательность GATGATATA - с гаплотипом Т-А-Т.

В работе проводили изучение аллельного полиморфизма ортологичного локуса *Du281* у особей *D. raddei*. Нуклеотидные последовательности аллелей представлены на **рис. 10**. Видно, что *D. raddei* также как и *D. (raddei) nairensis*, несут гаплотип Т-А-Т, однако аллельные варианты отличаются наличием делеций и транзиций во фланкирующих последовательностях. Обнаружены также мутации в микросателлитных кластерах.

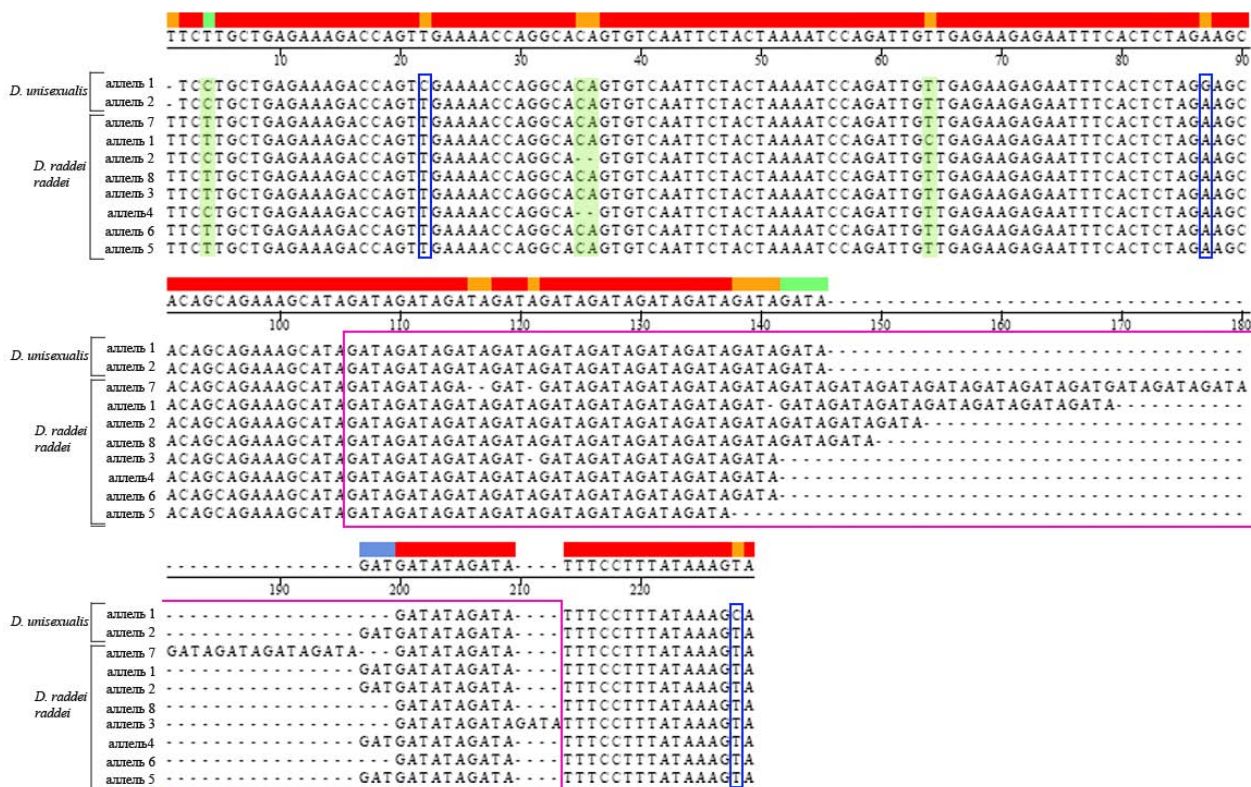


Рисунок 10. Нуклеотидные последовательности двух аллельных вариантов локуса *Du281* *D. unisexualis* в сравнении с двуполом видом *D. raddei*. Мутации во фланкирующих последовательностях ДНК выделены серым цветом. Однуклеотидные замены, образующие гаплотипы, обведены прямоугольником. Микросателлитный кластер выделен рамкой.

На рис. 11. приведены результаты секвенирования аллельных вариантов локуса *Du281* у особей *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita*.

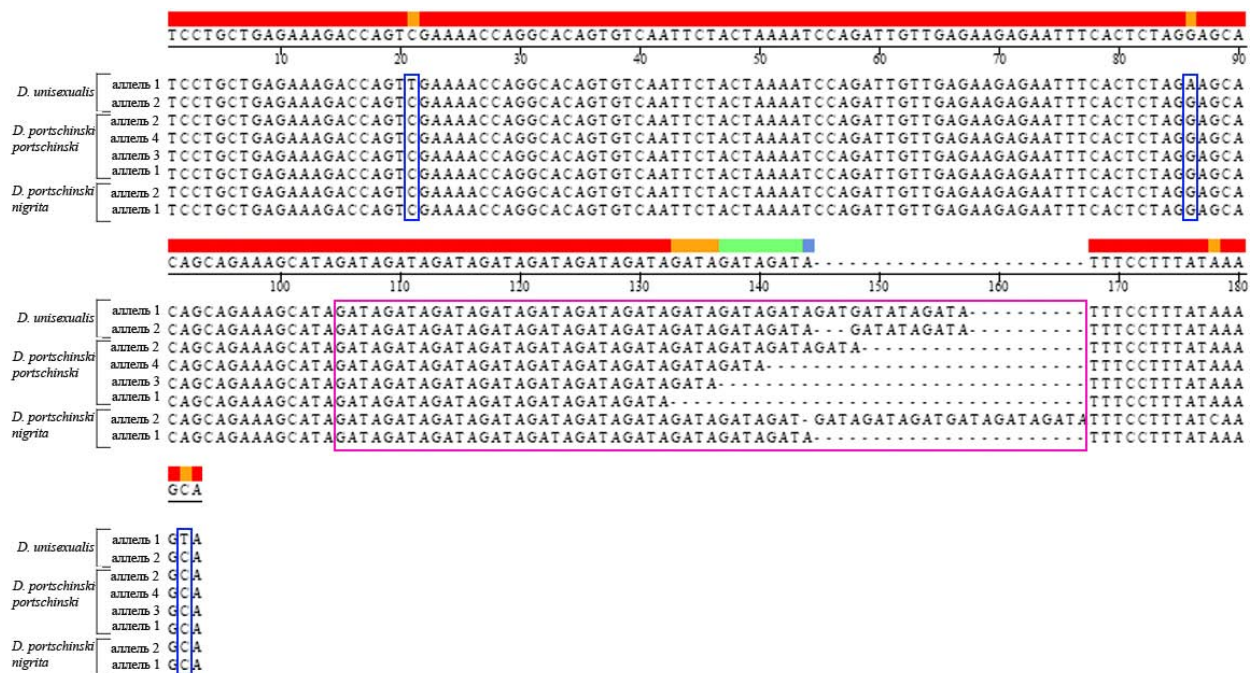


Рисунок 11. Нуклеотидные последовательности двух аллельных вариантов локуса *Du281* *D. unisexualis* в сравнении с двуполоми видами *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita*. Однуклеотидные замены, образующие гаплотипы выделены прямоугольником. Микросателлитный кластер выделен рамкой.

Видно, что аллельные варианты *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita* несут гаплотип С-Г-С. Аллели отличаются только длиной микросателлитного кластера, мутаций во фланкирующих последовательностях ДНК не обнаружено. Число мономерных звеньев у *D. portschinski portschinski* варьирует от 7 до 11, а у *D. portschinski nigrita*, от 10 до 16. У *D. portschinski portschinski* микросателлитный кластер состоит только из совершенных повторов. У *D. portschinski nigrita* в одном аллельном варианте произошли две однонуклеотидные делеции. Характерных для локуса *Du281 D. unisexualis* последовательностей GATGATATA и GATATA в конце микросателлитного кластера не обнаружено.

Результаты секвенирования аллельных вариантов локуса *Du281* у особей *D. dagestanica*, *D. caucasica*, *D. driada*, *D. chlorogaster* представлены на **рис. 12**.

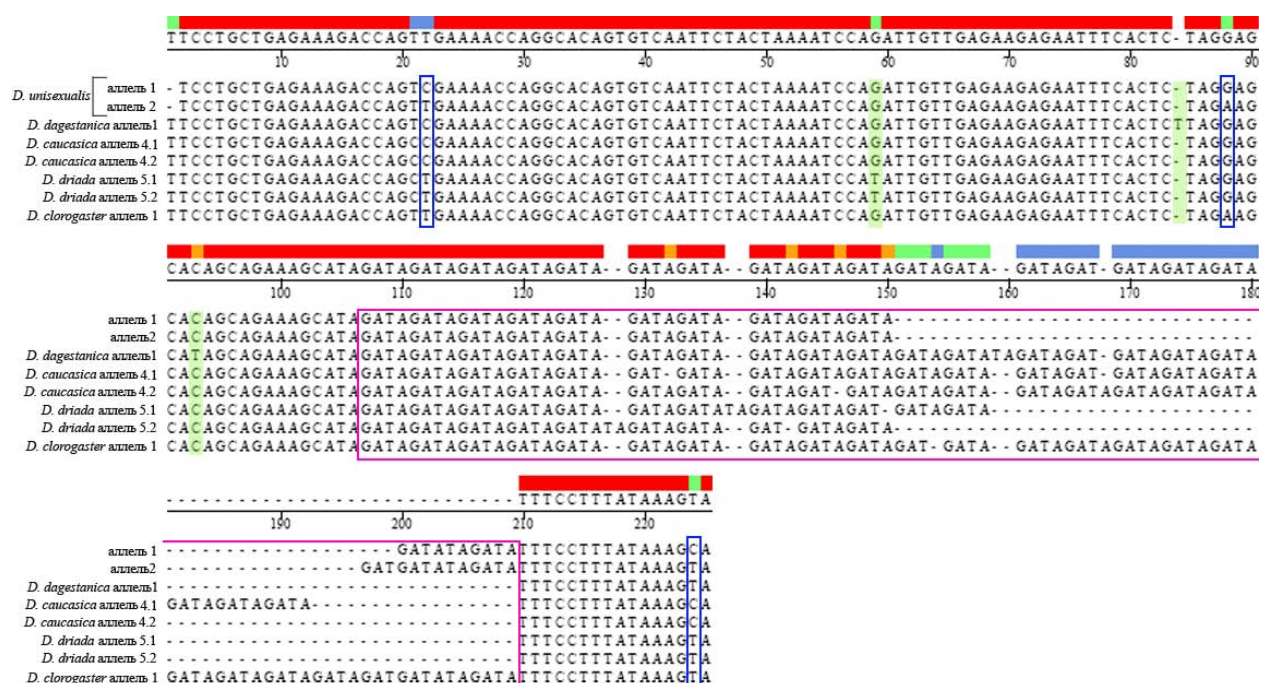


Рисунок 12. Нуклеотидные последовательности двух аллельных вариантов локуса *Du281 D. unisexualis* в сравнении с двуполовыми видами *D. dagestanica*, *D. caucasica*, *D. driada*, *D. chlorogaster*. Мутации во фланкирующих последовательностях ДНК выделены серым цветом. Однонуклеотидные замены, образующие гаплотипы, обведены прямоугольником. Микросателлитный кластер выделен рамкой.

У *D. caucasica* выявлен гаплотип CGC, а у *D. chlorogaster* - гаплотип Т-А-Т. У видов *D. dagestanica* и *D. driada* найдены другие гаплотипы - С-Г-Т и Т-Г-Т, соответственно. Число звеньев в микросателлитном кластере у этих видов варьирует от 10 до 24, в них выявлены инсерции динуклеотида ТА и делеции последнего нуклеотида «А» в GATA. Во фланкирующих последовательностях обеих аллелей *D. driada* найдена одна транзиция, а у *D. dagestanica* - одна транзиция и одна инсерция. У представителей *D. dagestanica*, *D. driada*, *D.*

chlorogaster присутствует консервативный элемент GATATA в составе микросателлитного кластера.

3.4 Секвенирование аллельных вариантов локуса *Du47* у ряда представителей двуполых видов рода *Darevskia*.

На рис. 13. представлены результаты секвенирования аллельных вариантов локуса *Du47* у особей *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita*.

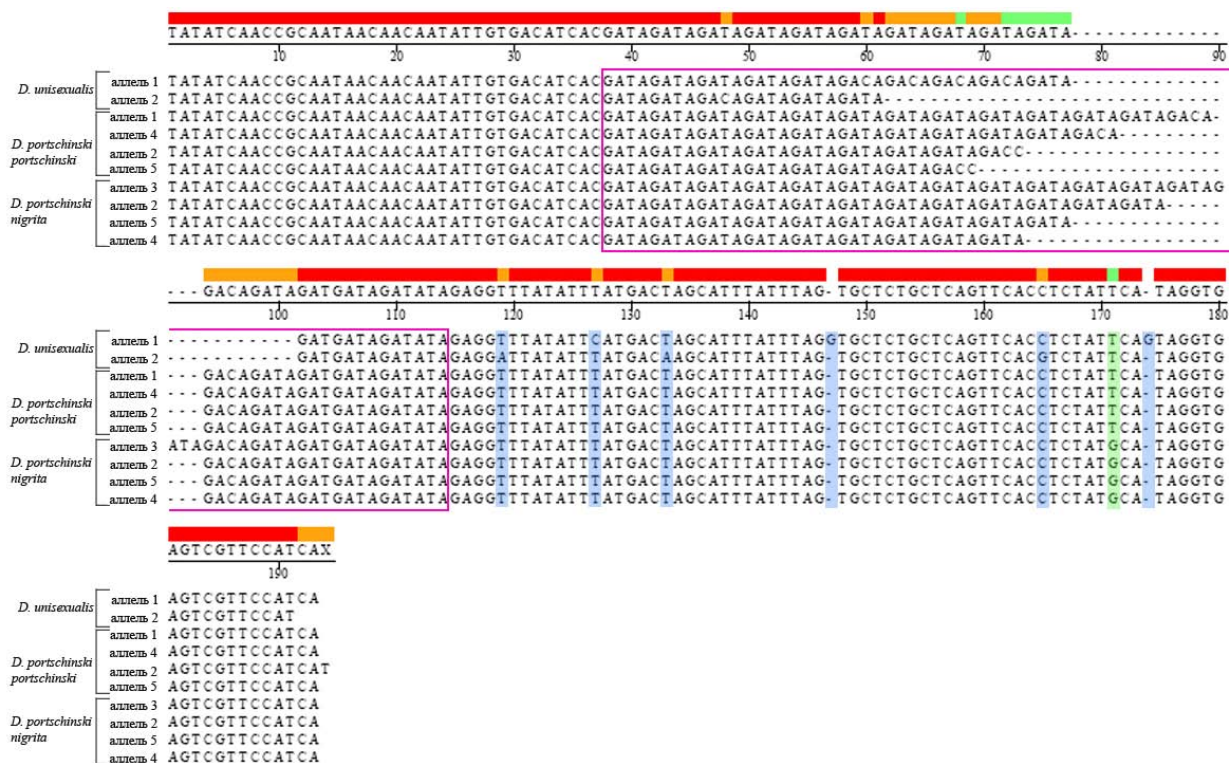


Рисунок 13. Сравнение нуклеотидных последовательностей двух аллельных вариантов локуса *Du47* *D. unisexualis* с нуклеотидными последовательностями аллельных вариантов локуса *Du 47* у двуполых видов *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita*. Микросателлит содержащий кластер выделен рамкой. Мутации во фланкирующих последовательностях ДНК выделены серым цветом.

У *D. portschinski portschinski* и *D. portschinski nigrita* ближе к началу микросателлитного кластера обнаружен микросателлит другого типа – GACA, и в конце микросателлитного кластера - консервативная последовательность GATAGATATA.

Результаты секвенирования аллельных вариантов локуса *Du47* у особей *D. dagestanica*, *D. caucasica*, *D. driada*, *D. chlorogaster* представлены на рис. 14. Между видами обнаружены значительные различия по длине и составу микросателлитного кластера. У *D. driada* выявлена инсерция последовательности AATAAATA, у *D. dagestanica* и *D. caucasica* встречаются мотивы GAGA, и у всех видов в начале микросателлитного кластера встречается микросателлит GACA. Как и в аллелях *D. unisexualis*, у этих видов в конце микросателлитного кластера

находится последовательность GATGATAGATATA. Во фланкирующих последовательностях найдены мутации типа транзиций и инсерций.

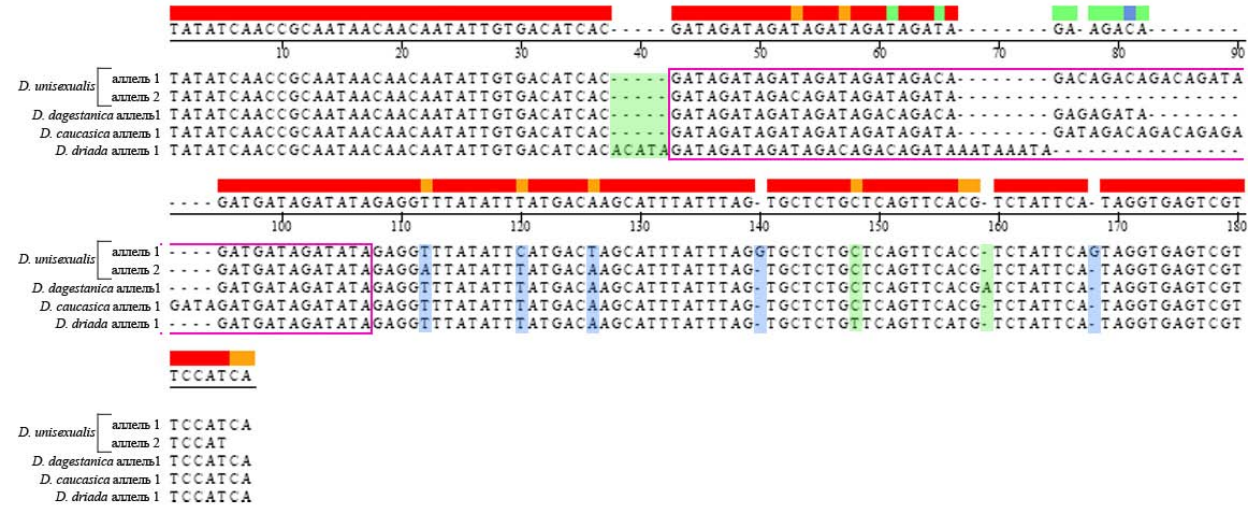


Рисунок 14. Нуклеотидные последовательности двух аллельных вариантов локуса *Du47* *D. unisexualis* в сравнении с различными двуполовыми видами рода *Darevskia*. Микросателлитный кластер обведен рамкой. Мутации во фланкирующих последовательностях ДНК выделены серым цветом.

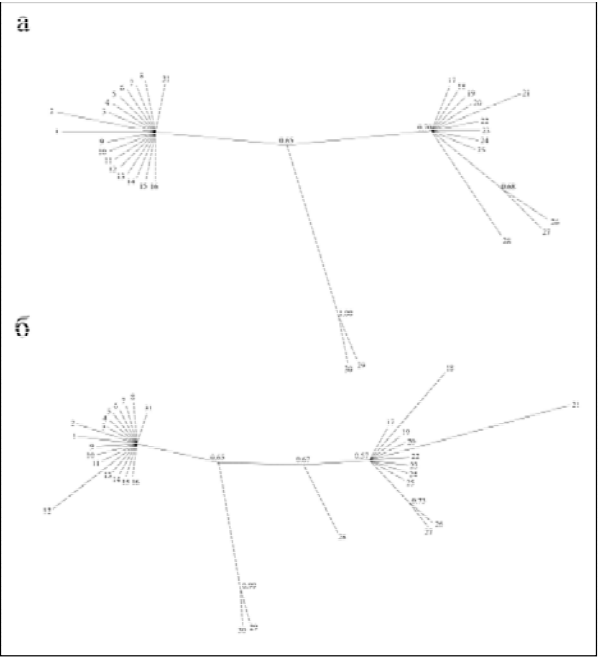


Рисунок 15. Байесовское древо аллелей локуса *Du281* для ряда представителей рода *Darevskia*. а - без учета микросателлитов, б - с учетом микросателлитов. 1-8 *D. raddei*, 9-12 *D. (raddei) nairensis*, 13-18 *D. unisexualis*, 19-20 *D. valentini*, 21-22 *D. portschinskii (nigrita)*, 23-25 *D. portschinskii*, 26-27 *D. caucasica*, 28 - *D. dagestanika*, 29-30 *D. driada*, 31 - *D. chlorogaster*.

3.5. Структурные взаимоотношения аллельных вариантов локуса *Du281* у разных видов рода *Darevskia*.

Структурные взаимоотношения аллельных вариантов локуса *Du281* у разных видов представлены в виде Байесовских деревьев на рис. 15. Данные деревья отражают существующий на сегодняшний день взгляд на эволюционные отношения в пределах рода *Darevskia* [Даревский, 1993].

3.6. Структурные взаимоотношения аллельных вариантов локуса *Du47* у разных видов рода *Darevskia*.

Структурные взаимоотношения аллельных вариантов разных видов ящериц по локусу *Du47* представлены в

виде Байесовских деревьев на рисунке 16.

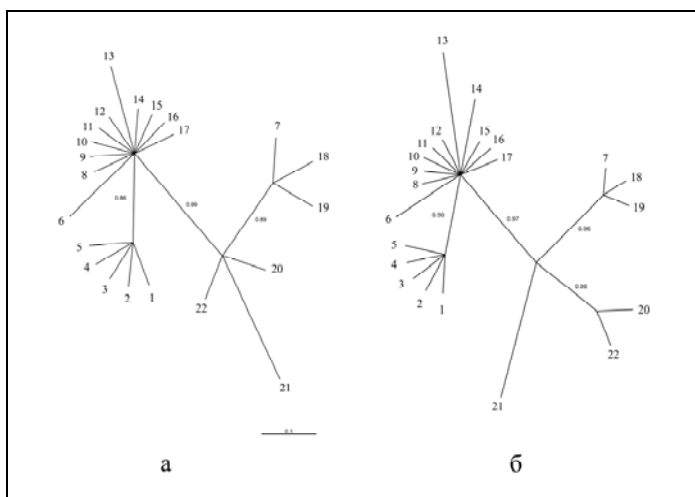


Рисунок 16. Байесовское дерево аллелей локуса *Du47* для ряда представителей рода *Darevskia*. а - без учета микросателлитов, б - с учетом микросателлитов. 1-5 *D. portschinskii (nigrita)*, 6-7 *D. unisexualis*, 8-11 *D. portschinskii*, 12-17 *D. valentini*, 18 - *D. raddei*, 19 - *D. (raddei) nairensis*, 20 - *D. caucasica*, 21 - *D. driada*, 22 - *D. dagestanica*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Однополые позвоночные - это уникальные модельные организмы для изучения генетической изменчивости, поскольку мутации можно легко обнаружить в клональных популяциях, семьях и последующих поколениях. Уровень их генетической variability не высокий по сравнению с родственными двуполыми видами [Dawley, 1989; Гребельный 2005]. Клональное разнообразие однополых видов принято объяснять

мутациями, гибридным происхождением и незаконной рекомбинацией [Parker and Selander, 1976; Parker, 1979; Cole *et al.*, 1988; Moritz *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 2000].

Ранее с помощью мультилокусного ДНК-фингерпринтинга было показано, что на фоне видоспецифических спектров партеновидов рода *Darevskia* выявляется генетическая неоднородность особей по некоторым микросателлитным маркерам [Кан *и др.*, 1998; Tokarskaya *et al.*, 2001; Мартиросян *и др.* 2002; 2003]. Анализ семей *D. unisexualis* и *D. armeniaca* выявил мутантные ДНК-фингерпринтные паттерны у потомков нескольких семей, которые отличались от материнских несколькими фрагментами [Tokarskaya *et al.*, 2004; Malysheva *et al.*, 2007]. Эти результаты показывают, что в геноме партеногенетических ящериц существуют нестабильные локусы, которые можно выявить с помощью микросателлитных проб. Но причины такой variability, механизмы ее возникновения не ясны. Очевидно, что для решения этих вопросов требуются новые подходы, в том числе анализ индивидуальных локусов.

Опубликовано мало работ по клонированию и характеристике индивидуальных микросателлитсодержащих локусов у однополых позвоночных. Так, Wilmhoff *et al.* [2003] клонировал и секвенировал 16 переменных динуклеотидных микросателлитных локусов партеногенетического геккона *Lepidodactylus lugubris*. Генетическая variability этих локусов, выявленная с помощью локус-специфического ПЦР анализа, оказалось неожиданно высокой. Gardner *et al.* [2004] изолировали и секвенировали шесть полиморфных локусов,

содержащих $(AAC)_n$ и $(AAAG)_n$ микросателлиты, из триплоидной партеногенетической формы австралийской ящерицы *Menetia greyii* и предложили использовать их для анализа непартеногенетических линий комплекса *M. greyii*. Однако молекулярную характеристику аллельных вариантов полиморфных локусов они не проводили.

Ранее в нашей лаборатории была создана геномная клонотека партеновида *D. unisexualis*, из которой были отобраны клоны, содержащие разные микросателлиты. Два – *Du281* и *Du215*, оказались полиморфными [Korchagin *et al.*, 2007]. В настоящем исследовании выделены и охарактеризованы три новых $(GATA)_n$ содержащих локусы и два локуса, содержащих $(TCT)_n$ и $(TCC)_n$ микросателлиты. Мы определили строение всех аллельных вариантов этих локусов, а для одного из них - аллели ортологов двуполых родительских видов. На популяционной выборке *D. unisexualis* (N=68) эти локусы оказались мономорфными, причем содержащие $(GATA)_n$ были гетерозиготами, а $(TCT/TCC)_n$ - гомозиготами.

По классификации [Weber and Wong, 1993] микросателлитные последовательности подразделяются на три категории: совершенные, несовершенные и сложные. Согласно этой классификации, локусы *Du418* и *Du161* содержат несовершенные микросателлитные звенья, а *Du47* включает как сложные, так и несовершенные микросателлитные мономеры. Несовершенные звенья типа GAT или TA могли возникнуть в результате мутации «сдвига рамки считывания» на неполное мономерное звено. В локусах *Du418* и *Du161* в составе микросателлитных кластеров были найдены последовательности TATATTТА и GGCTC соответственно; они могли появиться или в результате рекомбинационных событий, или мутации микросателлитного звена типа транзиций и трансверсий.

По локусам *Du418* и *Du47* не было обнаружено вариации по ЭФ подвижности ПЦР продуктов, а по локусу *Du161* была выявлена только одна отличающаяся особь. Интересно, что локус *Du418* у *D. unisexualis* амплифицировался в виде трех аллелей, тогда как у родительских видов он представлен двумя или одной аллелью. Наиболее вероятно, что третья аллель возникла в результате дупликации этого локуса у партеновида. Известно, что локусы, содержащие несовершенные повторы или вставки других по составу повторов, гораздо более стабильны, чем содержащие идеальные повторы [Bichara *et al.*, 1995; Heale and Petes, 1995]. Этим может объяснить мономорфность изученных $(GATA)_n$ -содержащих локусов. Причины стабильности

локусов *Du222* и *Du334* остаются неясными. Возможно, это связано с их относительно небольшими размерами или особенностями строения окружающих участков генома.

В каждом из $(GATA)_n$ содержащих локусов аллели также отличались несколькими делециями/инсерциями или транзициями и трансверсиями одного и более нуклеотидов во фланкирующих последовательностях ДНК. Возможно, что подобные нуклеотидные замены встречаются с определенной периодичностью в геноме различных видов ящериц рода *Darevskia*. Например, наличие точковых замен во фланкирующих областях было показано для локусов *Du215* и *Du281* у *D. unisexualis* [Корчагин, 2004a,b]. Они могут соответствовать горячим точкам мутаций, которые возникают вблизи повторяющихся элементов генома.

Механизмы нестабильности микросателлитных локусов в полной мере не известны, однако существует ряд гипотез по этому вопросу [Strand *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1996]. Нестабильность зависит от целого ряда факторов, главными из которых являются нуклеотидный состав и характеристики геномного окружения [Weissenbach *et al.*, 1992; Weber, Wong, 1993; Jin *et al.*, 1996; Goldstein, Pollok, 1997]. Изменения числа повторов коротких последовательностей обычно связывают с явлением “проскальзывания” нити ДНК во время репликации или репарации. Известны и другие механизмы, обуславливающие высокую частоту инсерций и делеций, а также многочисленные точковые мутации во фланкирующих микросателлит областях ДНК [Ellegren, 2000].

На панелях семейных образцов *D. unisexualis* и *D. armeniaca* нами были исследованы два полиморфных локуса – *Du281* и *Du215*. Сравнение аллелей у материнских особей и потомков проводилось по обоим локусам, однако только по *Du281* у потомков были выявлены *de novo* мутации. Подсчитанная частота мутаций равнялась $1,428 \times 10^{-1}$ событий на зародышевую ткань. Это хорошо соотносится с более высоким уровнем популяционного полиморфизма у *D. unisexualis* по локусу *Du281* в сравнении с *Du215* [Korchagin *et al.*, 2007]. В то же время, обнаруженная нами частота мутаций на порядок превышает значения, полученные для индивидуальных микросателлитсодержащих локусов у бисексуальных видов. Например, в родословных человека частота мутаций микросателлитных локусов варьировала от 3×10^{-3} до 6×10^{-4} [Ellegren, 2000b], в других работах приводится значение 10^{-4} [Dib *et al.*, 1996; Weissbach *et al.*, 1992]. Для $(AAAG)_n$ -локуса частота мутаций составляла 5.7×10^{-3} для деревенской ласточки – касатки [Brohede *et al.*, 2002], а для австралийской двуполой ящерицы

Egernia stokesii она равнялась 4.2×10^{-2} [Gardner *et al.*, 2000]. Гипервариабельный микросателлит (TATC)_n с частотой мутаций 1.7×10^{-2} был найден в X хромосоме человека [Mahtani and Willard, 1993]. У локуса, содержащего (GGCAGG)_n повторяющийся мотив, частота мутаций в клетках зародышевой линии грызунов была 8.8×10^{-2} на гамету [Mitani *et al.*, 1990]. Следовательно, микросателлитный локус *Du281* у *D. unisexualis* является гипермутабельным, и это первый пример такого локуса у однополых позвоночных.

Наличие в семье нескольких потомков с одинаковым мутантным фенотипом свидетельствует о том, что изменения произошли в герминальных клетках родителей. Фенотипически нормальные индивидуумы могут нести несколько гамет, произошедших клонально от одной предковой клетки, мутация в которой возникла у родителей на ранних стадиях развития [Yousoufian and Pyeritz, 2002]. В трех из четырех семей *D. unisexualis* паттерны мутаций были одинаковыми у всех потомков. Вероятно, они возникли в клетках зародышевой линии. В четвертой семье у одного из потомков паттерн мутации отличался от остальных. Эта особь могла мутировать дважды - сначала вместе с другими потомками, и затем на более поздней стадии дифференциации, или же мутация произошла однажды на поздней стадии дифференциации клеток зародышевой линии.

Для объяснения мутационного поведения микросателлитов предложено несколько основных моделей и ряд их модификаций. Согласно модели пошаговых мутаций (Stepwise mutation model) [Ohta and Kimura, 1973] мутации в микросателлитах происходят путем последовательного добавления или утраты одного повторяющегося звена. Основным фактором, приводящим к изменению длины аллеля, считается эффект “проскальзывания” ДНК-полимеразы в процессе репликации. Эта модель получила прямые и косвенные экспериментальные подтверждения [Schlotterer and Tautz, 1992; Weber and Wong, 1993], однако многочисленные наблюдения показали, что поведение микросателлитов далеко не всегда согласуется с обобщенным вариантом модели. Ее модифицированный вариант, “two-phase mutation model” [Di Rienzo *et al.*, 1994], предполагает, что в некоторых микросателлитных локусах мутации могут происходить либо последовательно, “шаг за шагом”, либо скачкообразно, приводя к огромному единовременному увеличению длины повтора (экспансии) [Wells, 1996; Djian, 1998]. Анализ индивидуальных микросателлитных локусов в различных организмах показывает, что от 5% до 75% мутаций носят характер мультиповторных мутаций [Ellegren, 2004]. Мутации, затрагивающие один

микросателлитный повтор, у человека происходят гораздо чаще, чем «многошаговые» мутации [Weber and Wong, 1993]. У рыб *Danio rerio* 68% мутаций в микросателлитных локусах мультиповторны (или имеют мультиступенчатый характер) [Shimoda *et al.*, 1999].

Описаны и более сложные процессы, происходящие в микросателлит содержащих локусах; такие как асимметрия в распределении мутаций вдоль кластера, инсерции и делеции, а также многочисленные точковые мутации, нуклеотидные замены во фланкирующих последовательностях ДНК [Rubinsztein *et al.*, 1995; Ellegren *et al.*, 1997; Colson, Goldstein, 1999]. Так, например, у краба *Limulus polyphemus* был обнаружен (CA)_n-содержащий микросателлитный локус размером 570 п.н. с 34 аллельными вариантами. Основные различия между аллелями были обусловлены полиморфизмом фланкирующих зон, содержащих нуклеотидные замены в 22-х сайтах [Orti *et al.*, 1997]. Скорость мутационных изменений в самих микросателлитах может быть ниже, чем скорость замен во фланкирующих областях ДНК [Ellegren *et al.*, 1997]. Так, у некоторых видов дрозофилы различия фланкирующих областей были выше, чем в самих микросателлитных повторах. Отличия аллельных вариантов могут ограничиваться только прилежащими участками ДНК [Colson and Goldstein, 1999].

Мы обнаружили *de-novo* мутации, затрагивающие несовершенный микросателлитный повтор (GATATA), т.е. более одного мономера. Наиболее вероятными механизмами подобной мутации могут быть двухфазная модель [Di Rienzo *et al.*, 1994]. В других семьях изменения ЭФ подвижности были вызваны делецией или инсерцией одного повтора GATA, что можно объяснить пошаговой моделью мутационных изменений [Kimura and Ohta, 1978]. Однако ни в одной семье не было найдено мутаций, затрагивающих фланкирующие последовательности ДНК.

Данные, полученные при изучении двуполых видов животных [Primmer *et al.*, 1998], а также человека [Amos *et al.*, 1996; Ellegren, 2000a] показали, что количество инсерций превосходит количество делеций. В нашем исследовании в 10 из 12 случаев мутация вела к уменьшению размера аллеля. Возможно, это связано со строением *Du281* локуса или с особенностями организации гибридного генома *D. unisexualis*.

Для оценки исторически накопленных мутаций по локусам был изучен аллельный полиморфизм локусов, ортологичных *Du47* и *Du281*, у разных двуполых видов рода *Darevskia*. Поскольку они двуполые, аллельный

полиморфизм может быть следствием как мутационных, так и рекомбинационных явлений. Особи *D. (raddei) nairensis* и *D. raddei* характеризуются высокой степенью генетического сходства по данным RAPD анализа [Рябинина и др., 1998], таксонопринтного анализа [Гречко и др., 1998], а также по данным исследования мтДНК [Moritz et al., 1992]. Результаты настоящей работы показали, что особи *D. (raddei) nairensis* и *D. raddei* идентичны и мономорфны по локусу *Du47*, но сильно отличаются по локусу *Du281*, причем различия затрагивают как структуру микросателлитсодержащего кластера, так и фланкирующие последовательности ДНК. Различия могут быть связаны с разной геномной локализацией *Du47* и *Du281*. Локус *Du281* может находиться в участке генома, более подверженном мутациям, чем *Du47*. Этим так же можно объяснить стабильность локуса *Du47* в популяциях *D. unisexualis*.

Ранее по данным RAPD анализа [Рябинина и др., 1998], таксонопринтного анализа [Гречко и др., 1998], рестрикционного картирования мтДНК [Moritz et al., 1992], мультилокусного аллозимного анализа [MacCulloch et al., 1995] и анализа первичной структуры двух генов мтДНК [Fu et al., 1997] было показано высокое генетическое сходство видов *D. portschinski* и *D. valentini*. Мы установили, что по локусу *Du47* *D. portschinski* (включая подвид *D. portschinski nigrita*) и *D. valentini* имеют идентичную структуру микросателлитного кластера, а у *D. portschinski portschinski* и *D. valentini* идентичные фланкирующие последовательности, отличающиеся от *D. portschinski nigrita* одной трансверсией. По локусу *Du281* *D. portschinski* и *D. valentini* идентичны по фланкирующим последовательностям, но отличаются по строению микросателлитного кластера. У *D. portschinski portschinski* он состоит из совершенных микросателлитных повторов, а аллели отличаются между собой числом мономерных звеньев. У *D. portschinski nigrita* встречаются несовершенные микросателлитные повторы, и локус менее вариабелен. Поскольку аллели, содержащие несовершенные повторы, гораздо более стабильны, можно предположить, что высокая вариабельность локуса *Du281* у *D. portschinski portschinski* связана с особенностями строения микросателлитного кластера. Подвиды *D. portschinski (portschinski и nigrita)* также вариабельны по *Du47* локусу. Как у *D. unisexualis*, в состав микросателлитного кластера входят сложные и несовершенные микросателлитные звенья. У *D. portschinski portschinski* встречается GACC микросателлит, который мог возникнуть в результате мутации GACA последовательности.

Аллели локусов *Du281* и *Du47* у представителей видов *D. dagestanica*, *D. caucasica*, *D. driada*, *D. chlorogaster* различаются мутациями типа транзиций, трансверсий и инсерций во фланкирующих последовательностях. Наиболее вероятно, что эти участки являются горячими точками мутаций. У всех исследованных нами видов количество транзиций превышает количество трансверсий. Известно, что транзиции GC→AT – одни из наиболее часто встречаемых спонтанных нуклеотидных замен, происходящих вследствие дезаминирования цитозина [Чобану и др., 2003]. Выявлены значительные отличия и по строению микросателлитного кластера, чаще всего – это мутации типа сдвига рамки считывания, приводящее к появлению несовершенных микросателлитных повторов, иногда это другие типы мутации, приводящие к появлению микросателлита другого типа. Структурные взаимоотношения аллельных вариантов изученных локусов у разных видов рода в виде Байесовских деревьев отражают существующий на сегодняшний день взгляд на эволюционные отношения в пределах рода *Darevskia* [Даревский, 1993]. Деревья, построенные с учетом и без учета изменчивости микросателлитов, имеют сходную топографию, что, возможно, связано с нахождением в составе микросателлитов исследованных видов эволюционно консервативных нуклеотидных группировок.

Таким образом, с помощью клонирования и секвенирования ДНК установлена молекулярная структура ряда микросателлитных локусов и их аллельных вариантов у партеновида *D. unisexualis*. В исследованной популяционной выборке эти локусы оказались мономорфными, что, возможно, связано с особенностями строения микросателлитных кластеров данных локусов, или со специфическими характеристиками прилежащих ДНК.

На двух больших выборках семейных образцов партеновидов *D. unisexualis* и *D. armeniaca* изучена стабильность (GATA)_n- содержащих локусов *Du281* и *Du215*. Полученные данные свидетельствуют о супернестабильности *Du281* у *D.unisexualis*: частота мутаций этого локуса достигает $1,428 \times 10^{-1}$ событий на зародышевую ткань, что на несколько порядков превышает среднюю частоту мутаций микросателлитов и сравнимо с наиболее нестабильными локусами, описанными у двуполовых видов. Выявлено и установлена структура 15 мутантных аллелей; показано, что большинство мутаций - это делеции одиночных микросателлитных мономеров. Показано, что *de novo* мутации у партеногенетических потомков возникают, вероятно, в результате ошибок при репликации ДНК и происходят в клетках зародышевой линии. Полученные

результаты являются первым прямым доказательством того, что мутации вносят существенный вклад в геномное разнообразие популяций клонально размножающихся позвоночных.

Генетико-инженерное изучение аллельных вариантов ряда микросателлитных локусов партеновидов *D. unisexualis* и их ортологов у двуполых видов позволило выявить особенности их мутационной изменчивости в группе ящериц рода *Darevskia*, которые связаны как с вариациями числа повторяющихся единиц микросателлитных кластеров, делециями и инсерциями в микросателлитах и в прилегающих областях ДНК.

ВЫВОДЫ

1. В работе впервые клонированы и охарактеризованы пять новых микросателлитсодержащих локусов у партеногенетических ящериц *Darevskia unisexualis*. Сходство спектров амплификации для каждого из локусов у 68 особей свидетельствует о том, что изученные популяции мономорфны по этим маркерам. Анализ их молекулярной структуры на популяционной выборке *D. unisexualis* показал, что исследованные особи гетерозиготны по локусам, содержащим (GATA)_n последовательности, и гомозиготны по локусам, содержащим (TCC)_n и (TCT)_n.
2. Частота мутаций, равная $1,428 \times 10^{-1}$, подсчитанная для локуса *Du281* на 49 семьях (168 потомков) *D. unisexualis*, свидетельствует о супернестабильности данного локуса. В связи с тем, что у *D. armeniaca* мутаций по этому локусу не было обнаружено, можно предположить, что супернестабильность локуса *Du281* проявляется не у всех партеногенетических видов этого рода.
3. Определена молекулярная структура 15 мутантных аллелей по локусу *Du281* у партеногенетических потомков первого поколения. Показано, что большинство мутаций происходит в клетках зародышевого пути и выражаются в делециях мономерного звена в микросателлитном кластере.
4. Сравнительный анализ первичной структуры аллельных вариантов локусов *Du281* и *Du47* у представителей двуполых видов рода *Darevskia* позволил установить особенности межвидовой изменчивости, связанной с вариациями числа мономеров в микросателлитных кластерах, делециями и инсерциями в микросателлитах и точковых нуклеотидных заменах в прилежащих к ним областях ДНК.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Ryskov A.P. Genetic variation and de novo mutations in the parthenogenetic Caucasian rock lizard *Darevskia unisexualis*. // Plos ONE, 2008, 3(7), e2730 (сайт: <http://www.plosone.org/home.action>).
2. Korchagin V.I., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N., Martirosyan I.A., Ryskov A.P. Molecular characterization of allelic variants of (GATA)_n microsatellite loci in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae). // Gene, 2007, 392(1-2): 126-133.
3. Бадаева Т.Н., Корчагин В.И., Токарская О.Н., Рысков А.П. Выявление и молекулярная характеристика мутантных аллелей локуса *Du281* у партеногенетических потомков *Darevskia unisexualis*. // Докл. Акад. Наук, 2006, 409(1): 120-122.
4. Tokarskaya O.N., Martirosyan I.A., Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Darevsky I.S., Danielyan F.D., Ryskov A.P. Instability of (GATA)_n microsatellite loci in the parthenogenetic Caucasian rock lizard *Darevskia unisexualis* (Lacertidae). // Mol. Gen. Genomics, 2004, 270: 509-513.
5. Токарская О.Н., Даревский И.С., Мартирисян И.А., Бадаева Т.Н., Корочкин Л.И., Даниелян Ф.Д., Петросян В.Г., Рысков А.П. Генетическая нестабильность (GATA)_n микросателлитных повторов ДНК и соматический мозаицизм у однополых ящериц *Darevskia unisexualis*. // Докл. Акад. Наук, 2003, 388(6): 825-828.
6. Рысков А.П., Мартирисян И.А., Бадаева Т.Н., Корчагин В.И., Даниелян Ф.Д., Петросян В.Г., Даревский И.С., Токарская О.Н. Супернестабильность (TCT/TCC)_n микросателлитных днк у партеногенетических ящериц *Darevskia unisexualis* (сем. Lacertidae). // Генетика, 2003, 39(9): 1172-1179.
7. Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Martirosyan I.A. Mutations as a major source of population genomic variation in clonally reproduced parthenogenetic lizards of genus *Darevskia*. The Biology of Genomes, 8-12 May 2007, Cold Spring Harbor, USA, p.28.
8. Badaeva, V. I. Korchagin, O. N. Tokarskaya, Ryskov A. P. "Microsatellite instability in parthenogenetic rock lizard *Darevskia unisexualis*". 14th European Congress of Herpetology, Porto, Portugal, 19-23 September 2007, p.174.
9. Бадаева Т.Н. Токарская О.Н. Рысков А.П. "Изучение вариабельности (TCT/TCC)_n микросателлитных ДНК партеногенетической ящерицы *Darevskia unisexualis* (*Darevskia*). " XVII зимняя молодежная научная школа «перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Москва, 7-10 февраля 2005, Тезисы докладов и стендовых сообщений стр. 53.
10. Martirosyan I.A., Korchagin V.I., Malysheva D.N., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N., Danielyan F.D., Darevsky I.S., Ryskov A.P. "Clonal diversity and genome instability in parthenogenetic lizards of genus *Darevskia*." The second international conference Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution. Yerevan, 8-11 September 2005, p.78.
11. Martirosyan I.A., Korchagin V.I., Malysheva D.N., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N., Danielyan F.D., Darevsky I.S., Ryskov A.P. "Study of clonal diversity, genome instability and genetically instable loci in parthenogenetic rock lizards genus *Darevskia*." 9th evolutionary meeting at Marseilles. 21-23 September Marseille, 2005. p.23.
12. Korchagin V.I., Martirosyan I.A., Malysheva D.N., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N., Ryskov A.P. "Study of genomic diversity, genetically unstable loci and somatic mosaicism in clonally reproduced (parthenogenetic) lizards, genus *Darevskia*." Advanced in molecular cell biology" devoted to the 10th anniversary of the center for Medical Studies (1993-2003). Moscow, June 17-18 2004, p. 73 – 82.
13. Martirosyan I.A., Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Petrosyan V.G., Danielyan F.D., Darevsky I.S., Tokarskaya O.N. "Variation multilocus DNA markers in parthenogenetic rock lizards *Darevskia unisexualis*." 12th ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. St. Petersburg, 12-16 August 2003, Programme & Abstracts p. 106.
14. Korchagin V.I., Martirosyan I.A., Malysheva D.N., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N. Highly instable (GATA)_n-containing sequences in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae). International conference "Molecular genetics of Eucariotes". Moscow, 4-7 February 2003, Institute of Gene Biology RAS. p.26.