МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2006, том 40, № 1, с. 61–73

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА. ПРОТЕОМИКА

УДК 577.113;577.212;577.21

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ЯДЕРНОЙ ДНК В ИССЛЕДОВАНИИ ВИДООБРАЗОВАНИЯ И СИСТЕМАТИКИ НА ПРИМЕРЕ ЯЩЕРИЦ “КОМПЛЕКСА *Lacerta agilis*” (SAURIA: LACERTIDAE)

© 2006 г. В. В. Гречко[1]*, Л. В. Федорова[1], Д. М. Рябинин[1], Н. Л. Рябинина[1], Д. Г. Чобану[2], С. А. Косушкин[1], И. С. Даревский[3]

[1]*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991*

[2]*Институт генетики Молдавской академии наук, Кишинев, 111120, Молдова*

[3]*Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034*

Поступила в редакцию 18.07.2005 г.

С целью сравнительного изучения молекулярно-генетического сходства некоторых популяций, подвидов и видов комплекса ящериц, объединяемых в группу *Lacerta* s. str., и представителей некоторых других родов использовали четыре вида маркеров ядерной ДНК, выявляемых методами таксонопринта, RAPD, IMP (Inter-MIR-PCR), а также при изучении нуклеотидной последовательности мономеров сателлитных ДНК. Представления о филогении и систематике этой группы рептилий, выработанные на основании морфологических и зоогеографических критериев, сопоставлены с выводами, основанными на молекулярно-генетических данных. Показано, что родовые и видовые подразделения популяций по ядерным молекулярным маркерам и по морфологическим признакам, в целом, согласуются, а степень генетических различий коррелирует с таксономией, предлагаемой зооморфологами. Различия между подвидами одного из изученных видов – *Lacerta agilis* – при сравнении разных молекулярных маркеров выражены неодинаково: по данным метода RAPD все подвиды существенно отличаются (при низкой внутрипопуляционной изменчивости этого признака), по другим маркерам эти различия выражены меньше и неравноценны. Подтверждается существование так называемых восточной и западной подгрупп этого вида, выделенных ранее другими авторами по результатам изучения мтДНК и по морфологии. Не обнаружено отчетливых градаций, выходящих за пределы индивидуальной изменчивости, в 14 популяциях подвида *L. agilis exigua* (восточная группа) по маркерам IMP несмотря на то, что эти популяции обитают на огромной территории от Урала до Кабардино-Балкарии. Эти данные можно рассматривать как свидетельство быстрого распространения подвида на север после плейстоценового оледенения (около 15000 лет назад).

Ключевые слова: молекулярная эволюция, молекулярная систематика, маркеры ядерной ДНК, геносистематика, геном рептилий, ящерицы, Lacertidae.

MOLECULAR MARKERS OF NUCLEAR DNA IN INVESTIGATION OF EVOLUTION AND SPECIATION PROCESS ON EXAMPLE OF “*Lacerta agilis* COMPLEX” (SAURIA: LACERTIDAE), by *V. V. Grechko[1]*, L. V. Fedorova[1], D. M. Ryabinin[1], N. L. Ryabinina[1], D. G. Ciobanu[2], S. A. Kosushkin[1], I. S. Darevsky[3]* ([1]Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moskow, 119991 Russia; *e-mail: grechko@eimb.ru; [2]Institute of Genetics, Moldova Academy of Sciences, Kishinev, 111120 Moldova; [3]Zoological Institute, Russian Academy of Science, St.-Petersburg, 199034 Russia). In order to elucidate the molecular-genetic relations of some *Lacerta* s. str. lizard populations, subspecies and species in comparison with some other genera we used methods revealing four types of nuclear DNA markers. Among these were taxonprint, RAPD, Inter-MIR-PCR markers and also satellite DNA monomer sequences. The aim was to compare the phylogeny and systematics of this reptilian group based on morphological and molecular criteria. This problem has a general importance for understanding a speciation process. Our results show a good correlation between both approaches when genera and species levels were studied. Systematic status of five subspecies of *L. agilis* were supported but not in all cases, some subspecies have no meaningful genetic differences by three types of molecular markers, but all of them were differed by RAPD markers. The data confirm the subdivision of *L. agilis*

Принятые сокращения: RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) – метод амплификации фрагментов ДНК с использованием коротких случайных праймеров; IMP (Inter-MIR-PCR) – метод амплификации фрагментов, расположенных между копиями повторов SINE типа MIR с использованием специфических праймеров.

*Эл. почта: grechko@eimb.ru

populations into west and east clades proposed by other authors earlier on the basis of mitochondrial DNA and morphology. The population structure of one of the subspecies – *L. agilis exigua*, was studied on a number of populations distributed from Ural region up to Kabardino-Balkaria by IMP method. There were no significant differences among these 14 populations investigated. The data testify the rapid distribution of the species after the end of Pleistocene glaciation.

Key words: molecular evolution, molecular systematics, nuclear DNA markers, reptilian genome, lizard, Lacertidae.

"If gene tree conflict with an accepted tree, one should stop and ponder why".
C.-B. Stewart [1].

Проблема соотношения (или соответствия) между морфологическим сходством организмов и их молекулярно-генетическим родством является ключевой в обсуждении перспектив изучения эволюции и видообразования. Многочисленные примеры противоречий между установившейся систематикой, которая, в принципе, должна отражать эволюцию и базироваться на иерархической степени родства, и данными молекулярногенетического анализа различных маркеров ДНК часто обескураживают биологов. Некоторые авторы высказывают мнение, что эти два подхода несовместимы и что систематика не "обязана" (или может не) использовать данные о степени молекулярного родства (результаты молекулярно-генетического анализа (см. обзор [2]). С другой стороны, распространено мнение, что современная систематика должна опираться только на молекулярные данные и не должна учитывать данные морфологии (см. обзор [3]). Можно полагать, что крайние точки зрения не всегда оправданы. Как показано в упомянутой работе [3], необходим некий синтез или, по крайней мере, понимание того, насколько морфологические и молекулярные данные, рассматриваемые вместе, помогают формированию научной систематики, основанной на структуре ДНК.

На этом пути возникают бесчисленные трудности как теоретического (например, отсутствие согласованной концепции понятия "вид", сложности анализа массивов молекулярных данных и получения однозначно трактуемых филогенетических построений [4–7]), так и практического толка, поскольку наиболее популярная теория кладизма пока не может предложить доступный и проверяемый способ построения биологической систематики (см. обзор [8]).

Не отрицая вероятности дальнейшего успешного развития филогенетических подходов кладизма, которые сделают возможным построение системы живого мира на основе его молекулярной филогении, отметим, что генетическое сходство и генетические дистанции, по крайней мере, на уровне низших таксонов, представляются также достаточно информативными с точки зрения проверки и уточнения систематического положения таксонов. Это мнение основано на том, что, во-первых, во множестве случаев имеются совпадения, или конгруэнтность, морфологических и молекулярно-генетических признаков таксонов (см. обзоры [9, 10]), свидетельствующие об отсутствии в этих случаях гомоплазий и об ортологичности обоих типов признаков. Во-вторых, на очевидном факте, что степень генетических различий косвенно отражает филогенетическое родство сравниваемых таксонов и монофилию наиболее сходных из них.

Еще в начале бума работ по молекулярной эволюции один из крупных исследователей Д. Хиллис сформулировал принципиальную посылку: "Поскольку исследуемый организм имеет единственную историю, выводы систематических исследований любого набора генетических признаков должны быть конгруэнтны выводам, которые можно сделать при изучении других наборов признаков того же организма. Конгруэнтность между этими выводами можно рассматривать как мощное свидетельство тому, что приоткрыта действительная историческая картина; конфликт между выводами может указывать на то, что теоретические предпосылки или технические аспекты недостаточно основательно продуманы в обоих подходах или в одном из них. Или просто необходимы дополнительные данные, чтобы понять причину конфликта и понять филогенетические отношения, которые мы исследуем" [11].

Исходя из этого принципа, можно полагать, что противоречие между морфологической и молекулярной систематикой, обнаруженное при использовании одного типа (или ограниченного числа) внешних признаков или молекулярных маркеров, не должно рассматриваться как катастрофа до получения данных по другим маркерам. Таксономия должна проверяться несколькими методами, и систематика верна, если предполагаемое на основании морфологических и зоогеографических признаков биологическое родство коррелирует с молекулярно-генетическим родством даже на основании одного типа маркеров. Если такой корреляции нет, то этот факт должен быть проверен при помощи других молекулярных маркеров, и, если они дают согласующиеся результаты, остается признать, что морфологические критерии, в изучаемом случае, выбраны неправильно, система должна быть изменена с учетом прямых дан-

ных о родстве на уровне ДНК. Эта логика, к сожалению, не всегда выдерживается, и большинство авторов изучает лишь один какой-либо вид молекулярных маркеров (чаще всего – митохондриальные гены), что нередко приводит к неоднозначным или, по крайней мере, промежуточным выводам.

Причиной противоречия между морфологической систематикой и выводами, основанными на каком-либо одном молекулярном методе, может быть гомоплазия (конвергенция, в широком смысле слова), которая может наблюдаться как на морфологическом, так и на молекулярном уровнях [4]. Гомоплазия в последнем случае менее опасна, поскольку вероятность ее понижается с увеличением набора признаков (число нуклеотидов) и типов молекулярных маркеров, характеризующих различные регионы ДНК, поэтому необходимо в каждом случае основывать филогенетические и генетические выводы на молекулярных маркерах разного типа [4]. Впрочем, поскольку во множестве случаев морфологическая систематика оказывается вполне жизнеспособной и согласуется с выводами молекулярной систематики даже при использовании одного вида маркеров (см. обзор [12]), опасность такого рода противоречий, на наш взгляд, преувеличена (см. также обзор [13]).

Исходя из этих посылок, мы сопоставили результаты применения четырех типов молекулярных маркеров в изучении генетического родства одной группы рептилий, а именно, некоторых видов и подвидов ящериц рода *Lacerta* s. str. ("комплекс *Lacerta agilis*"). Виды этого комплекса занимают обширный ареал – от Гибралтара и Швеции до Байкала и Казахстана – вторично заселив бóльшую часть этого пространства в период после последнего плейстоценового оледенения Евразии. По современным представлениям, отступление ледника и вечной мерзлоты началось примерно 15000 лет назад (см. обзор [14]).

"Комплекс *L. agilis*" включает, по разным источникам, семь или восемь видов (*L. agilis*, *L. strigata*, *L. viridis*, *L. bilineata*?, *L. media*, *L. schreiberi*, *L. trilineata*, *L. pamphilica*) [15–17], четыре из них подразделены на множество подвидов, равноценность которых вызывает сомнения (см. обзор [17]). Долгое время под названием *Lacerta*, предложенным около 250 лет назад Линнеем, объединяли, по мере их описания, огромное число европейских, кавказских и азиатских ящериц. После современной ревизии из рода *Lacerta* s. lato (в широком смысле) группа видов, родственных *Lacerta agilis* L., 1758, выделена в род *Lacerta* s. str. (в узком смысле) [18, 19]. Выделены также роды *Podarcis*, *Archaeolacerta*, *Iberolacerta*, *Darevskia* и некоторые другие [19–21]. В роде *Lacerta* s. str. морфологически более других изучен вид *L. agilis* [15, 17], что отразилось в подразделении его поначалу на два десятка подвидов, число и наименования которых оставались нестабильными. Часть подвидов далее рассматривали как синонимичные [15]; некоторые подвиды (например, *altaica* и *kurtuana* [22]) были обесценены. Имеются и другие неясности. Подвид *bilineata* вида *L. viridis* некоторыми авторами рассматривается сейчас как

Виды и подвиды *Lacerta* s. str, исследованные в работе

Вид и подвид	Число особей	Место сбора
L. agilis agilis	1	Германия, Дармштадт
L. a. exigua	2	Россия, Тульская обл.
»	3	» , Воронежская обл.
»	1	» , Липецкая обл.
»	2	» , Оренбургская обл.
»	3	» , Астраханская обл.
»	2	» , Кабардино-Балкария
»	1	» , Адыгея
»	2	» , Удмуртия
»	1	» , Калмыкия
»	2	» , Краснодарский кр.
»	4	Украина, Харьковская обл.
»	1	» , Днепропетровская обл.
»	1	» , Крым
L. agilis boemica	1	Россия, Кабардино-Балкария
L. agilis brevicaudata	3	Армения, Кучак
L. agilis chersonensis	3	Россия, Тульская обл.
»	1	» , Псковская обл.
»	1	» , Калининградская обл.
»	1	» , Ленинградская обл.
»	1	Белоруссия, Минская обл.
L. strigata	1	Россия, Дагестан
»	2	Армения, оз. Севан
L. viridis	2	Украина, Днепропетровская обл.
L. media	1	Армения, Аранлер

самостоятельный вид; неясна ценность разделения видов *media* и *trilineata* [17].

Эти и другие примеры отражают неустойчивость и незавершенность системы комплекса *Lacerta* s. str. и назревшую необходимость использования молекулярных маркеров для определения степени генетического родства географических популяций рода. До недавнего времени такие работы не проводились (см. “Обсуждение результатов”).

В нашей работе использованы маркеры, выявляемые методами таксонопринта [23, 24], Inter-MIR-PCR (IMP) [25, 26], RAPD [27], а также сателлитные ДНК, обнаруженные нами при изучении ДНК “комплекса *L. agilis*” [28–30]. Такой подход, использованный нами при изучении другого рода того же семейства ящериц – *Darevskia* – оказался достаточно информативным [28].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изученные виды и подвиды перечислены в таблице; на рис. 1 показана карта-схема мест сбора видов и подвидов ящериц, представленных в работе.

Выделение и анализ ДНК описаны ранее (см. ссылки в предыдущем разделе). В указанных статьях можно ознакомиться с экспериментальными деталями. Там же приведены методы анализа генетического сходства.

Построение дистанционных NJ-деревьев [31, 32] проводили как описано в упомянутых работах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ генетического сходства по данным метода таксонопринта

Метод позволяет получить электрофоретические картины распределения меченых повторов ДНК (таксонопринт) после ее исчерпывающего гидролиза какой-либо рестриктазой. Каждый таксонопринт содержит набор всех повторяющихся участков ДНК (не только сателлитных и диспергированных), выщепляемых данной рестриктазой. Как показано нами, картины распределения и интенсивность полос таксонопринта одинаковы у всех особей популяции и видо- и родоспецифичны [23, 24]. Очевидно, что чем больше сходство популяций по возможно большему числу таксонопринтов, тем более выражено генетическое родство. В тех случаях, когда удавалось собрать особей из разных популяций одного вида (как, например, нескольких популяций *Darevskia raddei*), оказалось, что географически близкие популяции практически одинаковы по маркерам таксонопринтов, а более отдаленные могут приобретать аутапоморфные для них признаки, что отражает начало видообразования [33]. Напротив, ДНК всех исследованных нами родов сем. Lacertidae (*Darevskia*, *Lacerta*, *Podarcis*, *Eremias*, *Gallotia*, *Zootoca*, *Ophisops*) существенно отличаются по всем таксонопринтам, обладая, тем не менее, несколькими синапоморфными для всех родов фракциями, т.е. специфичными для семейства Lacertidae [23]. Особенно важно то обстоятельство, что виды “комплекса *L. agilis*” и кавказские ящерицы “комплекса *L. saxicola*”, входившие ранее в один род *Lacerta* s. lato, существенно (по большинству таксонопринтов) различаются. Эти данные, вместе с другими, чисто морфологическими, послужили основанием для выделения “комплекса *L. saxicola*” в отдельный род *Darevskia* [19].

На рис. 2 в качестве примера представлены три таксонопринта из исследованных девяти, на которых можно видеть межродовые различия (роды *Darevskia* и *Zootoca*) по сравнению с видами “комплекса *agilis*”; между видами этого комплекса (*agilis*, *strigata*, *viridis*), а также между тремя

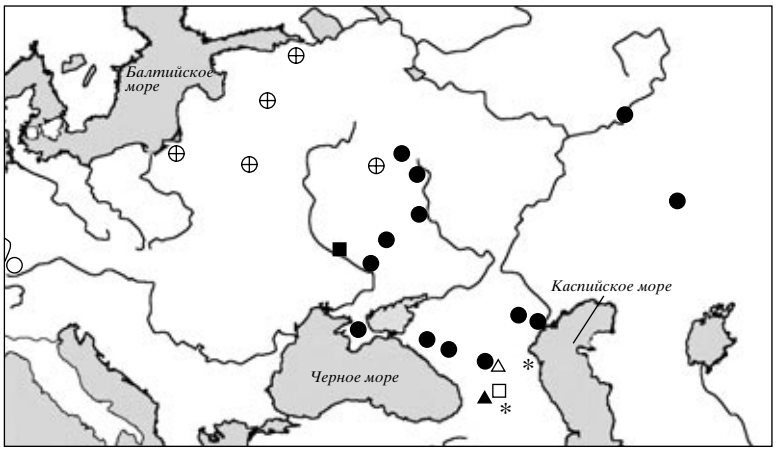

Рис. 1. Схема географической локализации исследованных популяций видов и подвидов *Lacerta* s. str. ● – *Lacerta agilis exigua*; △ – *L. a. boemica*; □ – *L. a. brevicaudata*; ⊕ – *L. a. chersonensis*; ○ – *L. a. agilis*; * – *L. strigata*; ■ – *L. viridis*; ▲ – *L. media*.

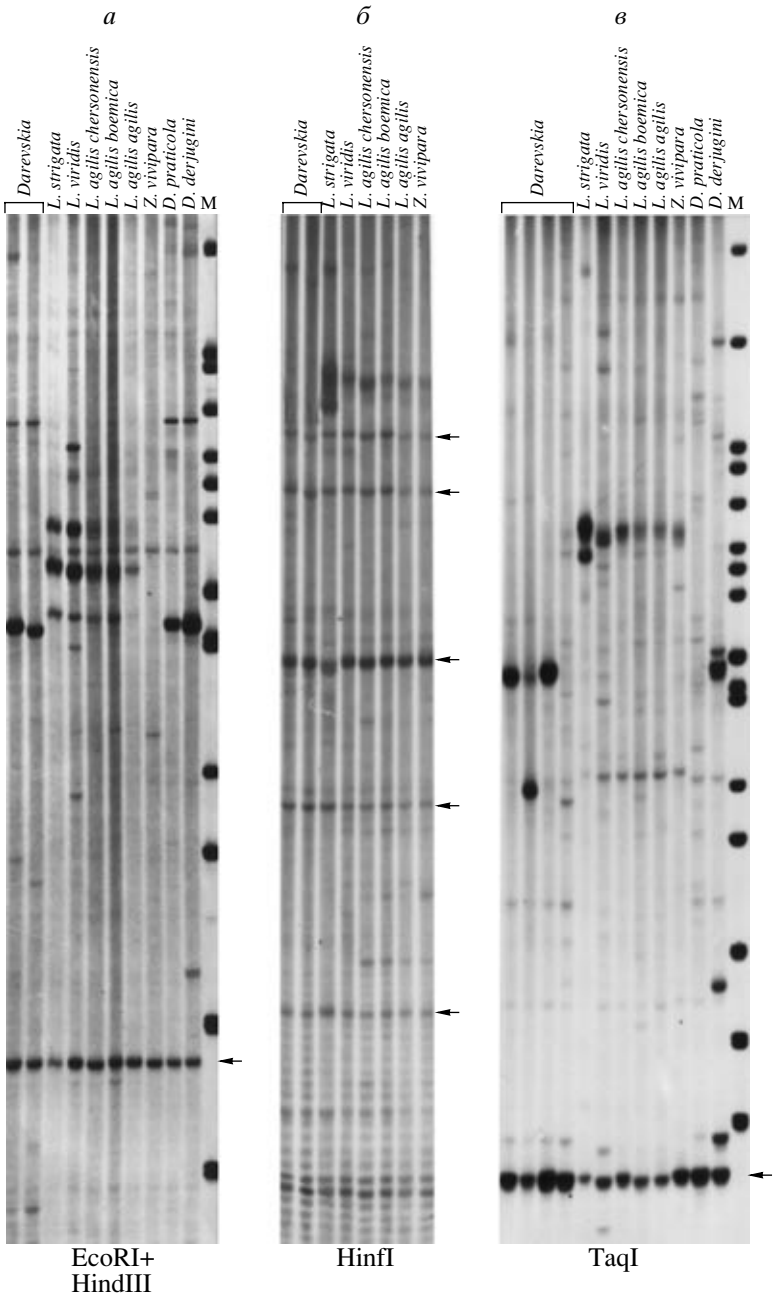

Рис. 2. Сравнение таксонопринтов ДНК некоторых видов и подвидов ящериц *Lacerta* s. str., родов *Darevskia* и *Zootoca* после расщепления ДНК рестриктазами: *а* – EcoRI + HindIII; *б* – HinfI; *в* – TaqI. Фракции повторов, общие для родов сем. Lacertidae, отмечены стрелками. М – маркеры длин фрагментов ДНК, п.н.

подвидами собственно *L. agilis* (*chersonensis*, *boemica*, *agilis*). Анализ всех этих и других таксонопринтов с построением матриц попарного сходства позволяет построить NJ-дерево генетического родства (рис. 3). Все роды сем. Lacertidae образуют отдельные клады, что подтверждает их морфологическую систематику. В соответствии с представлениями зоологов, к роду *Lacerta* s. str. генетически более близки роды *Zootoca*, *Darevskia* и *Podarcis*, а *Eremias*, *Gallotia* и *Ophisops* более далеки [18]. Такой "расклад" отмечен также при изучении фрагментов трех митохондриальных генов (12S, 16S рРНК и *cytb*) в работе группы Харриса [20, 21] и Фу [34].

Таким образом, по этим молекулярным маркерам три вида "комплекса *L. agilis*" (*agilis*, *strigata*, *viridis*) отличаются от остальных родов, а различия между видами комплекса незначительны. Это свидетельствует либо о консервативности повто-

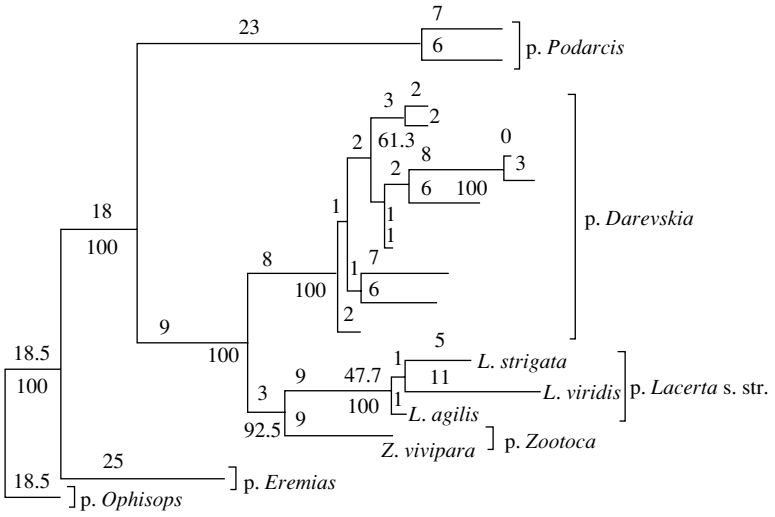

Рис. 3. Неукорененное NJ-древо некоторых родов ящериц сем. Lacertidae, построенное на основании сравнения всех исследованных таксонопринтов. Цифрами над линиями указано расстояние по Фитчу, под линиями – величины индексов бутстрепа (100 повторов). Величины бутстрепа ниже 50% не указаны.

ров в эволюции рода, либо о недавнем расхождении упомянутых видов.

Близкое внутриродовое сходство популяций, обозначенных в систематике как полные виды, подтверждено далее при изучении нуклеотидных последовательностей мономеров одного из повторов, выделенных из TaqI- и HindIII-таксонопринтов.

Анализ генетического сходства по данным изучения сателлитной ДНК

Нуклеотидные последовательности мономеров сателлитных ДНК и способ их организации в тандемные ряды представляют собой маркеры, обладающие таксонной специфичностью; они широко используются для изучения видообразования и молекулярно-генетического родства (см. обзоры [9, 10]). Ранее нами обнаружены и охарактеризованы семейства сателлитных ДНК ящериц р. *Darevskia* [26], а также трех упомянутых выше видов “комплекса *L. agilis*” (Agi160 [29, 30]). Оба семейства сателлитных ДНК, длина мономера которых составляет около 150 и 160 п.н. соответственно, имеют общего предшественника, поскольку обладают протяженными участками сходства [29]. Однако они обладают и отчетливо выраженными отличиями, превышающими отличия внутри каждого рода.

На рис. 4 сопоставлены последовательности (при множественном выравнивании) мономеров Agi160 трех видов “комплекса *L. agilis*”, на основании сравнения которых построено NJ-дерево генетического родства (рис. 5). В опыте исследовали также ДНК трех подвидов *L. agilis* (см. рис. 2). Видно, что последовательности мономеров распадаются на три клады, в общем соответствующие трем морфологическим видам. Однако положение подвидов *L. a. boemica* и *L. a. exigua* в видовой кладе достоверно не разрешается, в то время как третий подвид, *L. a. agilis*, отделяется от них (рис. 5).

Помимо трех основных видов комплекса в нашем распоряжении имелся образец ДНК четвертого вида, *L. media*, обитающего в Закавказье (подвид *isaurica*), нуклеотидные последовательности сателлита которого пока не определены. Согласно данным дот- и саузерн-гибридизации, в ДНК *L. media* повторы типа Agi160 также обнаруживаются, однако они или чрезвычайно вырождены, или их копийность существенно меньше, чем копийность повторов у других видов комплекса [30], поскольку интенсивность гибридизации с зондом, выделенным из *L. agilis*, мала и проявляется при более низких температурах отмывки [29, 30]. В обоих случаях можно предположить, что этот вид находится в более далеком родстве с первыми тремя видами, но входит в кладу *Lacerta* s. str.

Анализ генетического сходства по данным метода RAPD

Известно, что маркеры этого метода недостаточно информативны при изучении таксонов рангом выше вида и используются, в основном, в популяционном анализе [4]. Вариабельность электрофоретических паттернов полос при сравнении таксонов не может служить, по ряду причин, мерой их генетического родства, однако полное сходство паттернов, безусловно, подтверждает идентичность генетического материала по использованным праймерам, что свидетельствует о

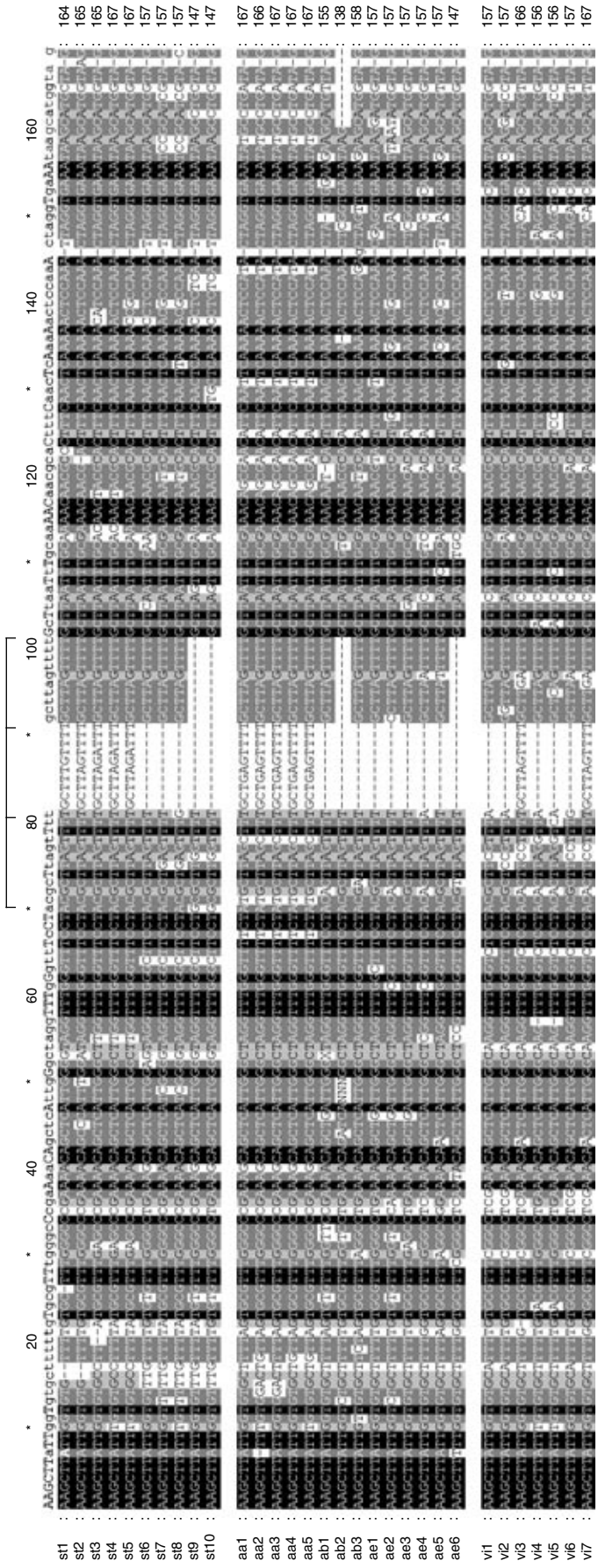

Рис. 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей мономеров сателлитного семейства Agi160 с использованием данных [26, 27] и настоящей работы. Черным обозначены участки полного сходства, серым – участки, имеющие единичные замены (индивидуальная вариабельность мономеров). Сверху показано положение трех декануклеотидов, некоторые из них делетированы. Гетерогенность числа декануклеотидов характерна для разных мономеров одного организма. aa – *L. agilis agilis*; ab – *L. a. boemica*; ae – *L. a. exigua*; st – *L. strigata*; vi – *L. viridis*.

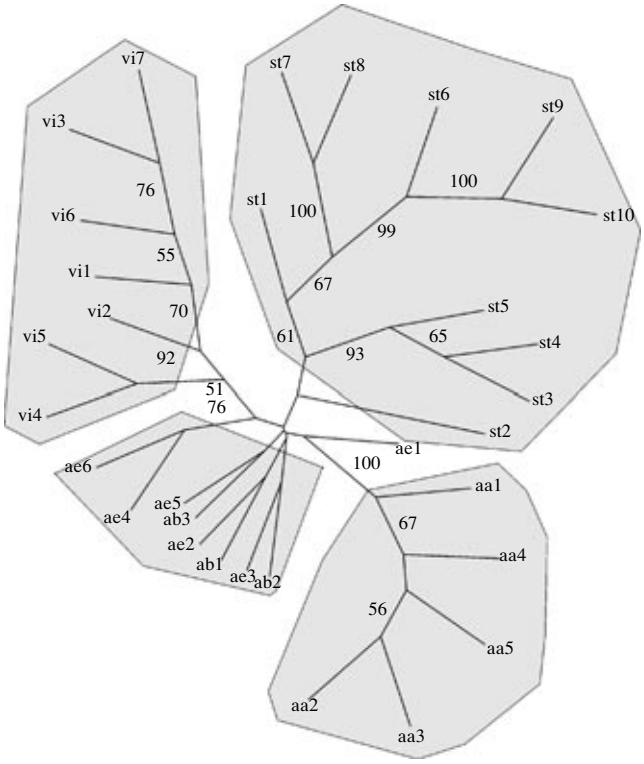

Рис. 5. Неукорененное NJ-дерево, построенное на основании сравнения последовательностей мономеров сателлитной ДНК Agi160, представленных на рис. 4. Обозначения, как на рис. 4. Выделены кластеры мономеров. Величины бутстрепа менее 50% не указаны.

ближайшем родстве или идентичности популяций. Потому сходство или сильно выраженные различия могут косвенно свидетельствовать о вероятности принадлежности особей к одному или к разным таксонам.

Из рис. 6*а* видно, что индивидуальной гетерогенности ДНК по этим маркерам практически нет ни у *L. strigata* (в двух популяциях – из Дагестана и Азербайджана), ни у *L. viridis* (одна популяция, Украина). Ранее аналогичные данные получены нами при изучении формально обозначаемых в системе пяти подвидов *D. saxicola* (*saxicola*, *darevskii*, *brauneri*, *szczerbaki*, *lindholmi*), четыре из которых, обитающие на Северном Кавказе, практически не отличаются друг от друга по маркерам RAPD, в то время как пятый подвид, *lindholmi*, обитающий в Крыму, существенно отличается и по маркерам RAPD, и по таксонопринтному анализу [23, 35]. Эти данные подтверждены при сравнении подсемейств специфичных для р. *Darevskia* сателлита CLsat, которое также показало, что крымский подвид отличается от кавказских как по набору подсемейств этого сателлита, так и по присутствию в нем уникального (аутапоморфного для вида) варианта сателлита, не найденного в других видах этого рода [36].

Что касается маркеров RAPD в ДНК разных видов и подвидов "комплекса *L. agilis*", то все они оказались полностью отличными (рис. 6*б*). Мы склонны рассматривать характеристику популяций по маркерам RAPD как хороший видовой признак в том случае, если эти паттерны или полностью сходны, или полностью отличаются друг от друга. Ранее на примере двух чрезвычайно близких по другим молекулярным характеристикам видов *D. valentini* и *D. portschinskii* мы показали, что паттерны их маркеров RAPD практически не отличаются друг от друга, что позволило нам высказать

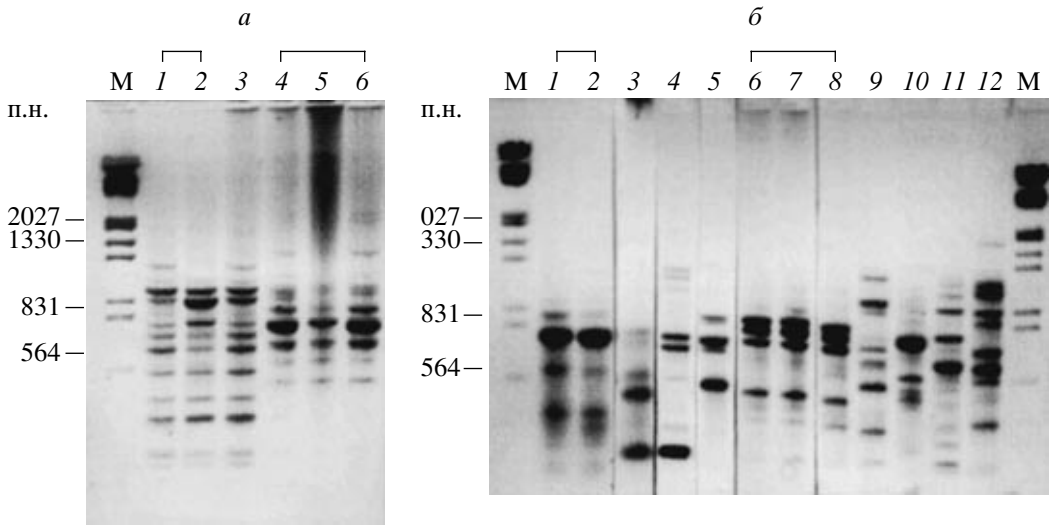

Рис. 6. Сравнение электрофоретических паттернов маркеров RAPD ДНК ящериц р. *Lacerta* s. str. В каждой лунке продукт амплификации участков ДНК одной особи. *а* – ДНК *L. strigata*, праймер А. *1* – популяция Дагестана; *2*, *3* – популяция Армении, Дилижан; *4–6* – *L. viridis*, популяция Украины, Днепропетровск. *б* – ДНК подвидов *L. agilis*, амплификация с праймером Б. *1*, *2* – *a. exigua*; *3* – *a. agilis*; *4* – *a. chersonensis*; *5* – *a. brevicaudata*; *6–8* – *a. boemica*; *9* – *L. strigata*; *10* – *L. viridis*; *11* – *Zootoca* (*Lacerta*) *vivipara*; *12* – *Podarcis taurica*. Скобками сверху обозначено число особей одной популяции вида (*а*) или подвидов (*б*). М – Маркеры, п.н.

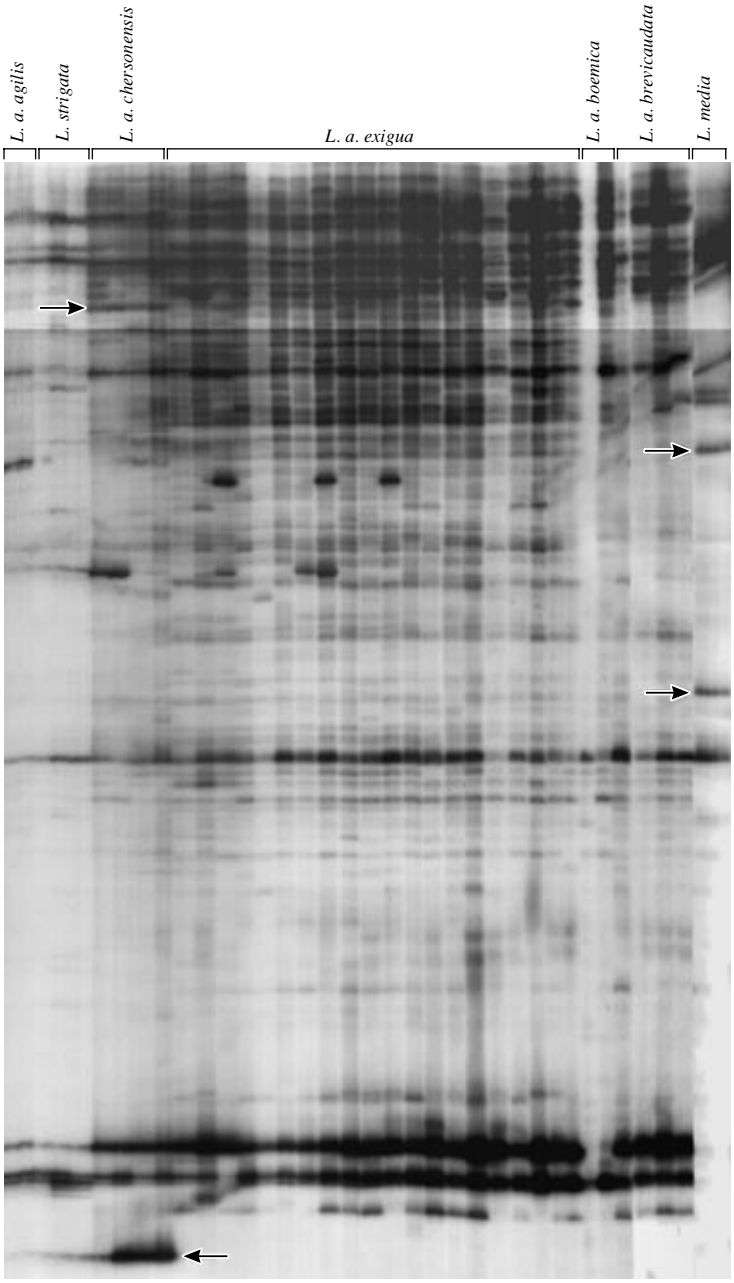

Рис. 7. Электрофоретические паттерны маркеров ДНК, амплифицированных в присутствии праймеров, комплементарных консервативным участкам повторов типа SINE (метод IMP [22, 23]). В каждой лунке содержится продукт ДНК одной особи. Популяции *L. a. exigua* указаны в таблице и на рис. 8.

сомнение в правомерности разделения этих видов, несмотря на их отличия по принятым в систематике морфологическим критериям [23]. Эти два вида также практически не отличимы по таксонопринтам [33] и по нуклеотидным последовательностям мономеров сателлита CLsat [37]. В случае *Lacerta* s. str. (рис. 6), напротив, все три вида существенно отличаются друг от друга по паттернам RAPD, не имея общих для них полос. Пять подвидов *Lacerta agilis* также различаются, но имеют синапоморфии для пары *a. agilis* и *a. chersonensis* (рис. 6, *3*, *4*) и тройки *a. boemica*, *a. brevicaudata* и *a. exigua* (рис. 6, *1*, *2*, *5*, *6–8*). На основании этих данных можно поддержать подвидовое подразделение *L. agilis*, хотя число признаков, выявляемых данным методом, оказалось небольшим, и возникла необходимость использования другого, более информативного метода. Поэтому далее мы использовали маркеры IMP, которые, по результатам изучения р. *Darevskia*, оказываются чувствительными именно на внутривидовом диапазоне [25] и дают большее число признаков.

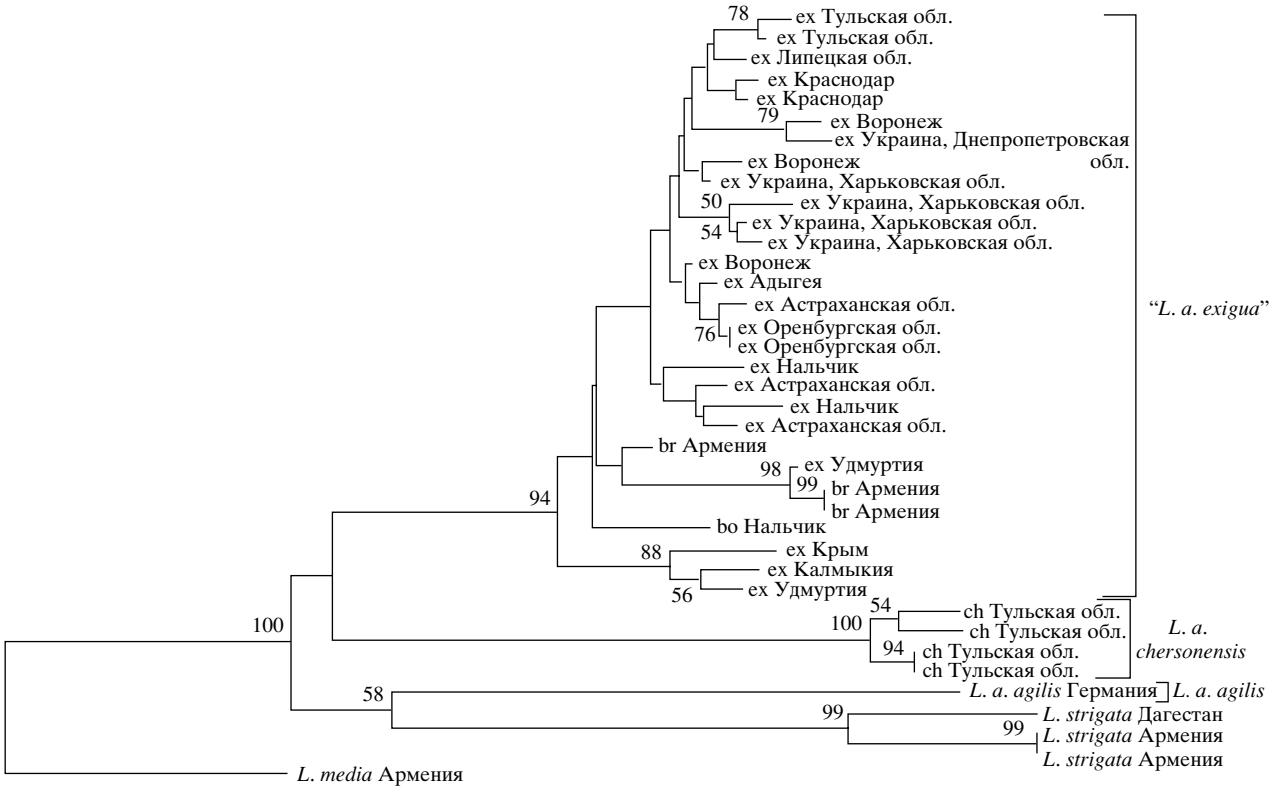

Рис. 8. NJ-дерево, построенное по матрице попарного сравнения маркеров IMP разных подвидов *L. agilis*, а также *L. strigata* и *L. media*. Расположение и аббревиатуры исследованных популяций *L. agilis* см. также рис. 1 и таблицу. Сокращения ex (*exigua*), bo (*boemica*), br (*brevicaudata*) и ch (*chersonensis*) относятся к морфологическим подвидам *L. agilis*, особи которых отловлены в местах, указанных на дереве.

Анализ генетического сходства по данным метода Inter-MIR-PCR (IMP)

Этот метод позволяет сравнивать размеры спейсерных участков ДНК, разделяющих копии диспергированных повторов типа SINE. Используют специфические праймеры к консервативным участкам этих повторов, что позволяет амплифицировать спейсеры достаточно близко расположенных копий (от нескольких десятков до сотен нуклеотидов). Поскольку гомологи повтора SINE типа MIR млекопитающих имеются у всех исследованных таксонов эукариот [38], мы использовали праймеры к консервативным участкам этого повтора [25, 26]. Установлено, что индивидуальная специфичность электрофоретических паттернов продукта амплификации у ящериц, как правило, невелика и может быть учтена в анализе. Вначале это показали на ДНК 12 особей одного подвида *D. derjugini* [25], затем в опытах, представленных здесь, в тех случаях, когда использовали ДНК нескольких особей того или иного вида (рис. 7). При попарном сравнении полосы, занимающие одинаковое положение в геле, считали гомологичными (независимо от их интенсивности), отсутствие же полосы рассматривали как отсутствие признака (матрица 1–0). Полученные матрицы представляли в виде деревьев при помощи программ TREECON [32] с использованием алгоритмов метода ближайшего связывания (NJ).

На рис. 7 представлена электрофоретическая картина, полученная в одном из опытов по изучению маркеров IMP. Различия между видами комплекса проявляются в присутствии как синапоморфных, так и аутапоморфных для каждого вида фракций (отмечены стрелками), которые выражены досточно отчетливо. Различия между подвидами *L. agilis* выражены слабее и труднее поддаются анализу из-за достаточно сильно выраженной индивидуальной гетерогенности (подвиды *agilis*, *chersonensis*, *exigua*, *boemica*, *brevicaudata*). Эта гетерогенность особенно маскирует популяционную структуру подвида *L. a. exigua*.

На основании этого и других опытов построено NJ-дерево (рис. 8), в котором каждый из подвидов, *exigua*, *boemica*, *brevicaudata*, по отдельности не кластеризуется. Эта группа обитает в восточной и юго-восточной части Европы; *chersonensis* и *agilis* из западной части России и Европы располагаются отдельно друг от друга (см. рис. 1).

Эти данные, в общем, согласуются с данными по маркерам RAPD (см. выше), которые указыва-

ют на близкое расположение подвидов *exigua*, *boemica* и *brevicaudata*, с одной стороны, и *chersonensis* и *agilis*, с другой. Поскольку число особей каждого подвида в наших опытах было неодинаковым (от 1 до 25), учесть индивидуальную гетерогенность каждого из подвидов при малом числе образцов трудно. Кроме того, не все подвиды были доступны нам (например, *bosnica*, *argus*, восточные популяции *exigua*). Вопрос остается открытым до получения результатов на выборке всех подвидов.

Тем не менее, и на основании уже полученных данных создается впечатление, что современные подвидовые категории далеко неравноценны и их систематика требует дальнейшего уточнения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сопоставляя данные использования разных молекулярных методов, можно сделать следующие выводы.

Во-первых, группа ящериц, обозначаемых собирательным наименованием "комплекс *L. agilis*", действительно образует отдельную кладу близкородственных видов, судя по маркерам таксонопринта и сателлитной ДНК, что поддерживает их родовой статус наряду с другими родами семейства (*Darevskia*, *Podarcis*, *Eremias*, *Ophisops*, *Gallotia*) (рис. 3 и [29]). Этот вывод базируется на результатах изучения четырех видов. Один из них – *L. media* – включен нами в комплекс на основании нескольких синапоморфных маркеров метода IMP (рис. 7) и на основании присутствия в нем сателлита Agi160, который не гибридизуется с ДНК ни одного из исследованных родов, кроме указанных четырех видов р. *Lacerta* s. str. [30]. Не изученный нами иберийский вид комплекса – *L. schreiberi* [39], объединяемый другими авторами [20] с *L. agilis* и *L. media* по сходству их митохондриальных генов, также может рассматриваться как член клады *Lacerta* s. str., как это и предлагалось на основании только зоологических признаков.

Во-вторых, наши данные свидетельствуют о том, что предлагаемое систематикой видовое подразделение комплекса (по крайней мере, в отношении видов, исследованных нами), в общем, коррелирует с кластеризацией видов по всем использованным типам маркеров (рис. 3, рис. 5, рис. 8).

В-третьих, определить малую степень генетических различий между морфологическими подвидами вида *L. agilis* достаточно трудно, поскольку в нашем распоряжении была репрезентативная выборка только подвидов *exigua* и *chersonensis* (рис. 8). В подвиде *L. a. exigua*, изученном в нашей работе с использованием метода IMP на примере множества популяций, собранных с огромной территории – от Удмуртии и Оренбургской области на юг, через Центральный район и Калмыкию до Кабардино-Балкарии (рис. 1), не удалось обнаружить отличий, выходящих за пределы индивидуальной изменчивости внутри каждой из этих популяций. Подвиды *brevicaudata* и *boemica*, хотя и представленные в наших опытах единичными особями, практически не отличаются от первого подвида, попадая в тот же диапазон индивидуальной и межвидовой изменчивости (рис. 8). Эти данные согласуются с нашими данными по маркерам RAPD (рис. 6) и по сателлитным ДНК, которые также показали, что указанные подвиды более сходны друг с другом внутри каждого из сочетаний (рис. 5). Однако необходимо отметить, что имеются сомнения в правильной идентификации особи подвида *boemica*, отловленной в окрестностях г. Нальчика, где соприкасаются ареалы этого подвида и подвида *exigua*, поэтому вывод о кластеризации *boemica* с *exigua* следует считать предварительным.

В пользу реальности подразделения *L. agilis*, по крайней мере, на два подвида – *exigua* и *chersonensis* – свидетельствует также тот факт, что популяции *chersonensis*, расположенные практически в условиях симпатрии с подвидом *exigua* в пределах Тульской и Псковской областей, отличаются от него существенно больше, чем любые из 14 популяций *exigua* между собой (см. рис. 1, черные кружки).

Таким образом, можно лишь полагать, что в настоящее время подвиды *L. agilis* распадаются на восточную (включая Кавказ) и западную ветви, первую из которых мы условно называем "*L. exigua*", а вторую – "*L. chersonensis*". Что касается наиболее западной популяции, обозначаемой как отдельный подвид *L. agilis agilis*, то можно лишь сказать, что единственная особь, имевшаяся в нашем распоряжении, располагается на дереве IMP отдельно от других подвидов, как ожидалось в соответствии с ее статусом и географическим положением. На NJ-дереве, построенном на основании сравнения мономеров сателлитной ДНК Agi160 (рис. 5), подвид *L. a. agilis* также образует отдельный кластер. (Промежуточный по локализации подвид между *agilis* и *chersonensis* – *argus* – в нашей работе не представлен.)

К аналогичному выводу пришли авторы, изучавшие подвиды *L. agilis* при помощи маркеров мтДНК (см. [22]). В выборке, исследованной авторами, подвиды *brevicaudata* и *boemica* представлены большим числом особей. Наши данные согласуются с мнением о том, что подвид *brevicaudata* не представляет отдельного таксона и должен рассматриваться как морфа восточной клады, включающей *exigua* [22].

Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что данные молекулярно-генетического анализа и морфологической систематики достаточно хорошо согласуются. Наиболее трудной и, воз-

можно, до конца не разрешимой проблемой остается проблема точного определения подвидового статуса с позиций молекулярной генетики – не только в нашем конкретном случае, но и в случае любого таксона. Это отражает объективную реальность переходного состояния разделяющихся и эволюционирующих популяций, в котором начальные этапы и темпы видообразования несомненно отличаются, затрагивая разные регионы ДНК. Эволюция этих регионов будет отличаться качественно и количественно в зависимости от условий среды, и вряд ли можно рассчитывать на выработку каких-либо равнозначных и объективных – не только морфологических, но и молекулярных – критериев для статуса подвида у всех, даже малых, таксонов, оставив эту проблему на качественном уровне.

И, наконец, отметим отсутствие существенных различий между популяциями подвида *L. agilis exigua* по маркерам IMP (рис. 8), которые бы выходили за пределы индивидуальной изменчивости в каждой из них. Это свидетельствует о том, что период времени после последнего плейстоценового оледенения Евразии (около 15000 лет назад [14]), в течение которого вид мигрировал на территории, простирающиеся не менее чем на тысячу километров с юга на север, недостаточно велик для межпопуляционной дивергенции и начала видообразования. Наши данные подтверждают данные Калябиной-Хауф и соавт. [17], которые показали, что изменчивость маркера мтДНК (фрагмент гена *cytb*) в популяциях тех же территорий ничтожно мала. Более того, они не обнаружили отличий по этому маркеру в Казахстанской популяции (район оз. Зайсан), расположенной еще более чем на 1000 км к востоку [17]. Кажется вероятным, что колонизация такого огромного пространства подвидом *L. agilis exigua* происходила поистине взрывным способом, чему могла способствовать благоприятная географическая ситуация – продвижение по лесостепным и степным территориям с относительно небольшим числом водных и горных преград. Эти рассуждения укладываются в рамки гипотезы Николса и Хьюитта [14, 39], согласно которой миграция в сторону новых местообитаний происходила за счет “пионерских” популяций чрезвычайно быстро, с сохранением максимальной гомозиготности и последующим выделением вида-основателя. Это объясняет низкий уровень генетической дивергенции в таких популяциях по сравнению с медленно распространяющимися популяциями основной “фаланги” (по названию авторов) (см. [39]), что и наблюдается в обсуждаемом нами случае.

Авторы благодарят Н.П. Жданову, В.Ф. Орлову и других зоологов, предоставлявших для анализа особи ящериц, а также К.Д. Мильто, без великодушной помощи которого при сборе и определении материала значительная часть этой работы не была бы возможной.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (02-04-49548, 03-04-49157).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stewart C.-B. 1993. The powers and pittfalls of parsimony. *Nature*. **361**. 603–607.
2. Антонов А.С. 2000. *Основы геносистематики растений*. М.: МАИК “Наука/Интерпериодика”.
3. Baker R.H., Gatesy J. 2002. Is morphology still relevant? In: *Molecular systematics and evolution: theory and practice*. Eds DeSalle R., Giribe G., Wheeler W. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag, 163–174.
4. *Molecular Systematics*. 1996. Eds Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., Sunderland, Mass., USA: Sinauer Ass.
5. Tautz D., Arctander P., Minelli A., Thomas R.H., Vogler A.P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol*. **18**, 70–74.
6. Lee M.S.Y. 1999. Molecular phylogeny become functional. *Trends Ecol. Evol*. **14**, 177–178.
7. Nichols R.A. 2001. Gene tree and species tree are not the same. *Biol. J. Linn. Soc*. **68**, 87–112.
8. Емельянов А.Ф., Расницин А.П. 1991. Систематика, филогения, кладистика. *Природа*. N **7**, 23–37.
9. Elder J.F., Turner B.J. 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quant. Rev. Biol*. **70**, 297–320.
10. Гречко В.В. 2002. Молекулярные маркеры в филогении и систематике. *Генетика*. **39**, 1527–1541.
11. Hillis D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches in evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst*. **18**, 23–42.
12. Avise J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2-nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer.
13. Brower A.V.Z., DeSalle R., Vogler A. 1996. Gene tree, species tree, and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst*. **27**, 423–450.
14. Hewitt G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol. J. Linn. Soc*. **68**, 87–112.
15. Даревский И.С., Щербак Н.Н., Петерс Т. и др. 1976. Систематика и внутривидовая структура. В кн.: *Прыткая ящерица*. Под ред. Яблокова А.В. М.: Наука, 53–68.
16. Bischoff W. 1991. Ubersicht der Arten and interarten der Familie Lacertidae. 3. Die Gattung *Lacerta*. In: *Die Eidechse, Mittellungblatt der AG Lacertiden in der DGHT*. Hefte **3**. Bonn/Bremen, 5–18.
17. Калябина-Хауф С.А., Ананьева Н.Б. 2004. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц *Lacerta agilis* L. 1758 (Lacertidae, Sauria, Reptilia) (опыт использования митохондриального гена цитохрома *b*). *Труды Зоологического института РАН*. **32**, 1–108.
18. Arnold N.E. 1989. Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: repationships within an Old-World family of lizards derived from morphology. *Bull. Br. Mus (Nat. Hist.) Zool*. **55**, 209–257.

19. Arribas O.J. 1999. Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archaeolacerta* Mertens, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian lacertid radiation. *Russ. J. Herpetol.* **l6**, 1–22.
20. Harris D.J. 1999. Molecular systematics and evolution of lacertid lizards. *Nature Croat.* **8**, 161–180.
21. Harris D.J., Arnold E.N., Thomas R. 1998. Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **265**, 1939–1958.
22. Kalyabina S.A., Milto K.D., Ananyeva N.B., Legal L., Joger U., Wink H. 2001. Phylogeography and systematics of *Lacerta agilis* based on mitochondrial cytochrome b gene sequence: first results. *Russ. J. Herpetol.* **8**, 149–158.
23. Grechko V.V., Fedorova L.V., Fedorov A.N. et al. 1997. Restriction endonuclease analysis of highly repetitive DNA as a phylogenetic tool. *J. Mol. Evol.* **45**, 332–336.
24. Fedorov A.N., Fedorova L.V., Grechko V.V. et al. 1999. Variable and invariable DNA repeat characters revealed by taxonprint approach are useful for molecular systematics. *J. Mol. Evol.* **48**, 69–76.
25. Ryabinina N.L., Bannikova A.A., Kosushkin S.A. et al. 2002. Estimation of the subspecies level of differentiation in Caucasian lizards of the genus *Darevskia* (syn. "*Lacreta saxicola* complex", Lacertidae, Sauria) using genome DNA markers. *Russ. J. Herpetol.* **9**, 185–194.
26. Borodulina O.R., Kramerov D.A. 2005. PCR-based approach to SINE isolation: simple and complex SINEs. *Gene.* **349**, 197–205.
27. Рябинина Н.Л., Гречко В.В., Даревский И.С. 1998. Полиморфизм ДНК популяций ящериц семейства Lacertidae, определяемый методом RAPD. *Генетика.* **34**, 1661–1667.
28. Чобану Д., Гречко В.В., Даревский И.С. 2003. Молекулярная эволюция сателлитной ДНК CLsat ящериц р. *Darevskia* (Sauria: Lacertidae): корреляция с видовым разнообразием. *Генетика.* **39**, 1527–1541.
29. Ciobanu D.G., Grechko V.V., Darevsky I.S., Kramerov D.A. 2004. New satellite DNA in *Lacerta* s. str. lizards (Sauria: Lacertidae): evolutionary pathways and phylogenetic impact. *J. Exp. Zool.* **302B**, 505–516.
30. Гречко В.В., Чобану Д.Г., Даревский И.С., Крамеров Д.А. 2005. Сателлитная ДНК рода *Lacerta* s. str. (группа *L. agilis*) сем. Lacertidae. *ДАН.* **400**, 392–395.
31. Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.
32. van de Peer Y., de Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for construction and drawing of evolution trees for Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569–570.
33. Гречко В.В., Рябинин Д.М., Федоров А.Н., Рудых И.А., Рысков А.П., Семенова С.К., Даревский И.С. 1998. Молекулярно-генетическая классификация и филогенетическое родство некоторых видов ящериц сем. Lacertidae на основании изучения специфичного распределения сайтов рестрикции в повторах ДНК (таксонопринта). *Молекуляр. биология.* **36**, 172–183.
34. Fu J. 2000. Toward the phylogeny of the family Lacertidae – why 4798 base pairs of mtDNA sequences cannot draw the picture? *Biol. J. Linn. Soc.* **71**, 203–217.
35. Ryabinin D.M., Grechko V.V., Darevsky I.S., Ryskov A.P., Semenova S.K., 1996. Comparative study of DNA repetitive sequences by means of restriction endonucleases among populations and subspecies of some lacertid lizard species. *Russ. J. Herpetol.* **3**, 178–185.
36. Чобану Д.Г., Гречко В.В., Крамеров Д.А., Даревский И.С. 2003. Новое подсемейство сателлитной ДНК, CLsatIV, ящериц *Darevskia lindholmi* (сем. Lacertidae): структура и эволюция. *ДАН.* **392**, 1–5.
37. Чобану Д.Г., Рудых И.А., Рябинина Н.Л., Гречко В.В., Крамеров Д.А., Даревский И.С. 2002. Сетчатая эволюция партеногенетических видов скальных ящериц сем. Lacertidae: наследование тандемных повторов и анонимных маркеров RAPD. *Молекуляр. биология*, **36** 296–306.
38. Gilbert W., Labuda D. 1999. CORE-SINE: eukaryotic short interspersed retroposone elements with common sequence motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 2869–2874.
39. Nichols R.A., Hewitt G.M. 1994. The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity.* **72**, 312–317.