

УДК 577.21:598.112

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЯЩЕРИЦ КОМПЛЕКСА *Darevskia raddei* ПО ДАННЫМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО МАРКИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ

© 2016 г. А. В. Омельченко¹, А. Е. Гирнык², Ф. А. Осипов^{2,3}, А. А. Вергун^{2,3}, В. Г. Петросян¹, Ф. Д. Даниелян⁴, М. С. Аракелян⁴, А. П. Рысков²

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва 119071
e-mail: omi@bk.ru

²Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334

³Московский педагогический государственный университет, Москва 119991

⁴Ереванский государственный университет, Ереван 0025

Поступила в редакцию 11.06.2015 г.

В статье приводятся генетические параметры для популяций ящериц комплекса *Darevskia raddei* (*D. raddei nairensis* и *D. raddei raddei*) и популяций *D. valentini*, рассчитанные на основе анализа изменчивости 50 аллельных вариантов трех микросателлит-содержащих локусов ядерных геномов у 83 особей. Показано, что генетические расстояния F_{st} между популяциями *D. raddei nairensis* и популяциями *D. raddei raddei* статистически незначимо отличаются от генетических расстояний F_{st} между популяциями разных биологических видов — *D. raddei* и *D. valentini* и статистически значимо превосходят генетические расстояния F_{st} между популяциями, принадлежащими к одному биологическому виду внутри рода *Darevskia*. Это свидетельствует о глубокой дивергенции популяций *D. raddei raddei* и *D. raddei nairensis* комплекса *D. raddei* и ставит вопрос о возможности отнесения их к разным биологическим видам.

Ключевые слова: вид, подвид, популяции, ящерицы, *Darevskia*, микросателлиты, генетические расстояния, F -статистика Райта, F_{st} .

DOI: 10.7868/S0016675816020089

Кавказские скальные ящерицы рода *Darevskia* (сем. Lacertidae) включают 27 двуполых и семь однополых (партеногенетических) видов, которые эволюционно родственны друг другу. Молекулярно-генетическое изучение этой группы ящериц представляет особый интерес, поскольку они были объектом интенсивных экологических и биогеографических исследований и, кроме того, партеногенез в этой группе, по-видимому, возникал неоднократно [1]. Все семь партеногенетических видов рода *Darevskia* образованы в результате различных комбинаций межвидовой гибридизации четырех двуполых видов: *D. raddei*, *D. mixta*, *D. valentini*, *D. portschinskii*. Однако механизмы, определяющие специфичность таких гибридизаций, остаются неясными. Согласно Мерфи и соавт. [2] образование партеновидов в этой группе имеет филогенетические ограничения и, возможно, связано с генами половых хромосом двуполых родительских видов. Так, например, популяции комплекса *D. raddei* (*D. r. raddei* и *D. r. nairensis*) являются всегда материнскими в межвидовых гибридизациях с *D. valentini* и *D. portschinskii* при образовании пяти из семи партеновидов рода

Darevskia. В то же время таксономический статус этих популяций остается предметом исследования на протяжении многих лет, в течение которых *D. raddei* и *D. nairensis* относили к разным видам, подвидам или одному виду в зависимости от характера исследования и типа генетических маркеров. В настоящей работе для получения новой информации о таксономическом статусе популяций комплекса *D. raddei* мы впервые использовали в качестве генетических маркеров микросателлитные ДНК, скорость мутирования которых позволяет детектировать внутривидовые, межвидовые и видовые микроэволюционные события. В качестве контрольной группы были взяты популяции двуполых ящериц *D. valentini* с твердо установленным видовым статусом.

В работе использованы коллекционные образцы ДНК ящериц *D. r. raddei* (семь популяций: “Егегнадзор” 39°47'48.4" N, 45°19'52.4" E; “Тегард” 40°08'49.4" N, 44°48'26.9" E; “Гош” 40°42'20.3" N, 45°00'57.7" E; “Кельбаджар” 40°06'03.1" N, 45°59'27.1" E; “Татев” 39°23'13.2" N, 46°15'11.2" E; “Дорога” 39°22'53.98" N, 46°21'6.63" E; “Горис” 39°33'09.5" N, 46°21'19.7" E,

19 особей), *D. r. nairensis* (шесть популяций: “Пьюник” 40°36'49.9" N, 44°35'06.4" E; “Лчач” 40°28'02.4" N, 45°03'43.5" E; “Лчашен” 40°30'45.92" N, 44°54'3.22" E; “Ереван” 40°10'37.0" N, 44°36'09.3" E; “Бжни” 40°27'42.6" N, 44°39'07.3" E; “Айриванк” 40°26'02.3" N, 45°06'27.2" E, 45 особей) и *D. valentini* (четыре популяции: “Лчашен” 40°30'45.92" N, 44°54'3.22" E; “Кучак” 40°31'49.81" N, 44°17'3.43" E; “Тэж” 40°42'8.08" N, 44°36'30.80" E; “Адис” 40°18'14.91" N, 44°43'40.71" E, 19 особей) из Армении. В работе использованы молекулярно-генетические методики исследования (выделение ДНК, подбор праймеров и условий ПЦР), описанные ранее [3]. Для генотипирования использовали микросателлитные локусы Du215 (21 аллельный вариант), Du281 (21 аллельный вариант), Du323 (8 аллельных вариантов). Все выявленные аллели секвенированы на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant. Секвенированные последовательности аллелей депонированы в GenBank под номерами GU972551–GU972552; KM573717–KM573727 (*D. valentini*); HM014002–HM014003; KM573728–KM573762 (комплекс *D. raddei*).

Генетические параметры популяций (гетерозиготность, равновесие по Харди–Вайнбергу, F_{st}) определяли с помощью компьютерных программ GenePop v.4.2 и Web-версии программы POP-TRREEW (<http://www.med.kagawau.ac.jp/~genom-elb/takezaki/poptrrew/index.html>). Данные генетические параметры сравнивались как между популяциями одного вида (только для *D. r. raddei*, только для *D. r. nairensis* и только для *D. valentini*), так и между популяциями заведомо разных биологических видов (*D. r. raddei*–*D. valentini* и *D. r. nairensis*–*D. valentini*), а также среди изучаемых (целевых) популяций *D. r. raddei*–*D. r. nairensis*. Расчеты по описательной статистике (среднее арифметическое, дисперсии, размах, стандартные отклонения и ошибки) и дисперсионному анализу (ANOVA) выполнены с применением компьютерной программы STATISTICA 7. Построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью программы MEGA 6.06 [4].

Генетическое разнообразие (гетерозиготность) популяций, p -значения для оценки равновесия по Харди–Вайнбергу и F_{st} -статистики представлены в таблице (данные параметры для малочисленных выборок (1–2 особи) не показаны). Среднее значение гетерозиготности для популяций *D. r. raddei* равно 0.434 (± 0.219), для популяций *D. r. nairensis* – 0.507 (± 0.127), для популяций *D. valentini* – 0.525 (± 0.052). Данные различия по результатам дисперсионного анализа не являются статистически значимыми: $F(2, 14) = 2.3336$; $p = 0.13316$.

Также из таблицы следует, что в основном частоты аллелей в популяциях соответствуют закону Харди–Вайнберга. Однако в некоторых популяциях (Егегнадзор и Татев) наблюдается отклонение от этого закона в сторону уменьшения частот гетерозигот, а в некоторых популяциях (Пьюник, Лчашен (у *D. valentini*) и Ереван) то же отклонение обусловлено увеличением численности гетерозиготных особей. Причин отклонения генетических параметров исследуемых нами популяций от закона Харди–Вайнберга может быть несколько. Оценка влияния мутационного процесса на смещение равновесия Харди–Вайнберга в нашей работе строится с учетом темпов изменчивости тех локусов, для которых равновесие Харди–Вайнберга вычисляется. В нашем исследовании особи генотипируются по гипервариабельным микросателлитным локусам, поэтому очевидно, что показатели равновесия Харди–Вайнберга будут значимым образом зависеть от мутаций в этих участках геномов, а также что скорости изменчивости аллелей этих локусов вполне достаточны для использования этого типа генетических маркеров для оценки показателей равновесия Харди–Вайнберга. При этом даже высоковариабельные микросателлитные локусы по-разному (иногда неравномерно и разнонаправленно) влияют на смещение равновесия Харди–Вайнберга. Так, локусы Du215 и Du323 демонстрируют смещение равновесия по Харди–Вайнбергу в сторону увеличения численности гетерозигот в популяциях (при H_1 : число гетерозигот увеличилось, $p = 0.0063$ и $p \ll 0.0001$ соответственно), а локус Du281 – смещение равновесия по Харди–Вайнбергу в сторону уменьшения гетерозигот (при H_1 : число гетерозигот уменьшилось, $p = 0.0075$). В малочисленных популяциях увеличение доли гетерозигот происходит тогда, когда в популяции имеет место различие частот разных аллелей между полами. Таким образом, можно предположить, что в популяциях Пьюник, Лчашен (у *D. valentini*) и Ереван самки и самцы демонстрируют статистически значимый частотный дисбаланс по разным аллелям, тогда как в популяциях *D. r. raddei* частоты разных аллелей одинаковы вне зависимости от пола особи. Следует отметить, что явление неравномерного действия отбора на самцов и на самок, в частности, приводит к тому, что происходит увеличение частот гетерозигот в последующих поколениях. Возможно, именно этим объясняется увеличение частот гетерозигот в популяциях Пьюник, Ереван (у *D. r. nairensis*) и Лчашен (у *D. valentini*).

Также на примере популяций Егегнадзор и Татев у *D. r. raddei*, вероятно, можно наблюдать действие эффекта Валунда (Wahlund effect), при котором исследуемые популяции подразделены на субпопуляции, где преимущественно и происхо-

Уровни значимости для оценки гипотез закона Харди–Вайнберга, гетерозиготность (средняя для всех локусов) и генетические расстояния F_{st} между популяциями *D. r. raddei*, *D. r. nairensis* и *D. valentini*

Вид	Популяция	Число особей	Гетерозиготность (стандартная ошибка)	Равновесие по Харди–Вайнбергу (p -уровень)		Среднее генетическое расстояние F_{st} от популяций		
				Н1: число гетерозигот уменьшилось	Н1: число гетерозигот увеличилось	<i>D. raddei</i>	<i>D. nairensis</i>	<i>D. valentini</i>
<i>D. r. raddei</i>	Егегнадзор	8	0.539 (0.271)	0.000	1.000	0.284	0.346	0.468
	Гегард	3	0.500 (0.251)	0.464	0.869	0.316	0.381	0.488
	Гош	1	–	–	–	0.432	0.486	0.571
	Кельбаджар	1	–	–	–	0.675	0.688	0.738
	Татев	3	0.481 (0.241)	0.005	1.000	0.301	0.375	0.497
	Дорога	2	–	–	–	0.315	0.320	0.509
	Горис	2	–	–	–	0.422	0.427	0.592
<i>D. r. nairensis</i>	Пьюник	17	0.437 (0.236)	1.000	0.000	0.488	0.154	0.519
	Лчап	5	0.527 (0.128)	0.956	0.098	0.427	0.102	0.474
	Лчашен	14	0.611 (0.111)	0.898	0.111	0.345	0.123	0.432
	Ереван*	6	0.593 (0.093)	0.998	0.003	0.366	0.108	0.441
	Бжни	1	–	–	–	0.432	0.185	0.488
	Айриванк	2	–	–	–	0.533	0.175	0.550
<i>D. valentini</i>	Лчашен	4	0.542 (0.028)	1.000	0.030	0.543	0.476	0.083
	Кучак	2	0.500 (0.072)	–	–	0.564	0.497	0.207
	Тэж	6	0.505 (0.005)	0.996	0.004	0.562	0.494	0.114
	Адис	7	0.554 (0.104)	0.525	0.462	0.537	0.469	0.082

Примечание. Значения p -уровней, при которых принимается альтернативная гипотеза (Н1), выделены жирным шрифтом.

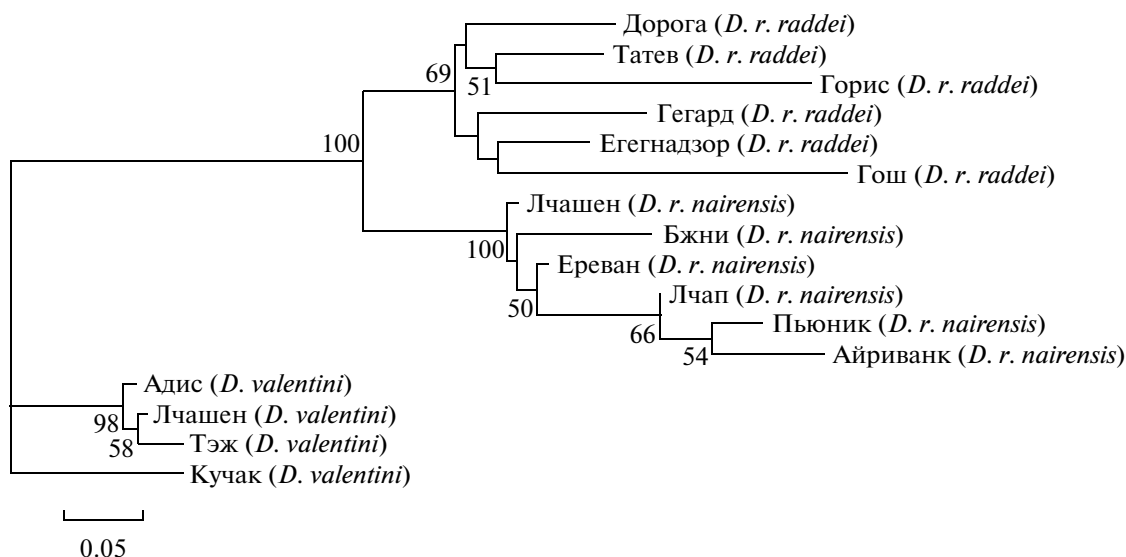
* В настоящее время вопрос о принадлежности ереванской популяции к *D. r. nairensis* является дискуссионным: первоначально И.С. Даревским данная популяция была отнесена к *D. r. nairensis*, хотя некоторые исследователи (включая Ф.Д. Даниеляна) считают ее принадлежащей к *D. r. raddei*.

дит скрещивание, что ведет, в среднем, к уменьшению численности гетерозигот.

Кроме того, нельзя исключить влияние малых объемов выборок, при которых расчетные значения равновесия по Харди–Вайнбергу могут демонстрировать смещение. Однако выборки из популяций, у которых значение параметров равновесия по Харди–Вайнбергу смещены, не являются самыми малочисленными в нашем исследовании.

Далее, в таблице представлены значения F_{st} для пар популяций заведомо различных видов, заведомо одного вида и популяций *D. r. raddei*–*D. r. nairensis*. Из представленных данных следует, что популяции ящериц, относящиеся к одному биологическому виду, характеризуются значением F_{st} равным 0.239 (± 0.014), популяции ящериц разных биологических видов – 0.519 (± 0.014), а популяции *D. r. raddei*–*D. r. nairensis* – 0.432 (± 0.027).

Для исключения влияния случайных флуктуаций значений F_{st} нами было проведено ϕ -преобразование для этих значений и проведен их дисперсионный анализ. Он демонстрирует, что все три группы популяций значимо отличаются друг от друга по этому показателю: $F(2, 48) = 29.344$ ($p \ll \ll 0.0001$). Конкретизация различий апостериорным критерием Тьюки показывает, что данные различия обусловлены в основном различиями F_{st} значений между популяциями ящериц одного вида и популяциями ящериц из разных видов ($p = 0.000126$). При этом F_{st} значения популяций *D. r. raddei*–*D. r. nairensis* значимо отличаются от популяций ящериц заведомо одного вида ($p = 0.000169$) и не отличаются от значений F_{st} у популяций различных биологических видов ($p = 0.122981$). Следует отметить, что полученные F_{st} значения для популяций ящериц одного вида из рода *Darevskia* соответствуют F_{st} значениям для



Филогенетическое дерево популяций *D. r. raddei*, *D. r. nairensis* и *D. valentini*, построенное на основании расстояний F_{st} алгоритмом кластеризации по методу “ближайшего соседа” с бутстреп-поддержкой в 1000 итераций.

популяций ящериц одного вида из других родов. Так, в работе по изучению генетической структуры популяций зеленой ящерицы *Lacerta viridis* [5] показано, что значения F_{st} для симпатрических популяций находятся в диапазоне от 0.076 до 0.167, а для аллопатрических популяций — от 0.134 до 0.345.

На основании попарного сравнения популяций в рамках расстояний на основании F_{st} значений нами с использованием алгоритма ближайшего соседа и с применением бутстреп-поддержки было построено филогенетическое дерево изучаемых популяций, которое представлено на рисунке. На нем с достаточно большой вероятностью обособлены куст популяций *D. r. raddei* и куст популяций *D. r. nairensis*. Популяция Кельбаджар (*D. r. raddei*) исключена из построения дерева, так как из нее взята малочисленная выборка и, кроме того, она сильно удалена и обособлена от других популяций, а также особь из этой популяции характеризуется уникальными мутациями в микросателлитных локусах, которые привели к тому, что в популяции Кельбаджар аллель № 1 локусов Du215 и Du323, а также аллель № 16 локуса Du281 одновременно перешли в гомозиготное состояние (см. GenBank KM573728; HM014002; KM573762).

Таким образом, в результате данного исследования показано, что генетические расстояния, построенные на основании аппарата F_{st} -статистики между популяциями *D. r. raddei* и *D. r. nairensis*, не отличаются от генетических расстояний между популяциями различных видов. Следует отметить, что первоначально все нынешние виды ящериц рода *Darevskia* рассматривались в каче-

стве подвидов одного вида — *Lacerta saxicola*. Затем по мере накопления данных об их биологии каждый из них был выделен в отдельный вид, в том числе и двуполовый вид *D. raddei*. При этом *D. raddei nairensis* рассматривался как подвид *D. raddei*. В 1989 г. исследования авторов показали, что *D. raddei* и *D. nairensis* репродуктивно изолированы, так как имеют различные временные периоды размножения и различное половое поведение [6, 7]. Это дало серьезные основания полагать, что *D. raddei* и *D. nairensis* — разные виды. Использование молекулярно-генетических методов анализа привело к новому пересмотру их статуса. Изучение 36 аллозимных локусов не выявило различий по фиксированным аллелям между *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* [8]. Анализ изменчивости последовательностей гена цитохрома *b* показал, что они не образуют независимые монофилетические группы [1]. Это находится в соответствии с данными аллозимного анализа и говорит о том, что исследованные популяции относятся к одному виду. Использование методов RAPD и Inter-SINE-PCR [9] также не выявило значительных различий между изученными популяциями комплекса *D. raddei*. Поэтому эти авторы считают, что нет оснований выделять *D. r. nairensis* в отдельный вид и ставят под сомнение и его подвидовой статус. В то же время использование более эффективных маркеров (таких как микросателлитные ДНК) и популяций из более широкого ареала, как это следует из совокупности полученных нами данных, позволяет сделать вывод о глубокой дивергенции популяций *D. r. raddei* и *D. r. nairensis* комплекса *D. raddei* и о возможности отнесения их к разным биологическим видам.

Работа частично финансировалась грантами программ Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, “Живая природа” и грантами Президента РФ по поддержке научных школ (№ НШ-25.01.2014.4) и молодых ученых (№ МК-2349.2014.4 и МК-6509.2015.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fu J., MacCulloch R.D., Murphy R.W., Darevsky I.S. Divergence of the cytochrome *b* gene in the *Lacerta raddei* complex and its parthenogenetic daughter species: Evidence for recent multiple origins // *Coreia*. 2000. V. 2. P. 432–440.
2. Murphy R.W., Fu J., MacCulloch R.D. et al. A fine line between sex and unisexuality: the phylogenetic constraints on parthenogenesis in lacertid lizards // *Zool. J. Linnean Society*. 2000. V. 130. P. 527–549. DOI: 10.1006/zjls.1999.0241.
3. Korchagin V.I., Badaeva T.N., Tokarskaya O.N. et al. Molecular characterization of allelic variants of (GATA)_n microsatellite loci in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis* (Lacertidae) // *Gene*. 2007. V. 392. P. 126–133. DOI: 10.1016/j.gene.2006.11.020.
4. Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // *Mol. Biology and Evolution*. 2013. V. 30. P. 2725–2759. DOI: 10.1093/molbev/mst197.
5. Bohme U., Schneeweiss N., Fritz U. et al. Small edge populations at risk: genetic diversity of the green lizard (*Lacerta viridis viridis*) in Germany and implications for conservation management // *Conservation Genetics*. 2007. V. 8. I. 3. P. 555–563. DOI: 10.1007/s10592-006-9191-0.
6. Даниелян Ф.Д. Теория гибридного происхождения партеногенеза в группе кавказских скальных ящериц (экспериментально-теоретическое исследование): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Киев: Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена АН Украины, 1988. 42 с.
7. Даниелян Ф.Д., Даревский И.С. Скальные ящерицы Армении *Lacerta raddei* Voetger и *Lacerta nairensis* Darevsky, формы подвидового или видового рангов // Тез. докл. научной конференции по зоологии АН Армении, 1998. С. 28–29.
8. Bobyn M.L., Darevsky I.S., Kupriyanova L.A. et al. Genetic variation among populations of the Caucasian rock lizards of the *Lacerta raddei* complex from Armenia // *Amphibia–Reptilia*. 1996. V. 17. P. 233–246.
9. Гречко В.В., Банникова А.А., Косушкин С.А. и др. Молекулярно-генетическое разнообразие комплекса ящериц *Darevskia raddei* (Lacertidae: Sauria): ранние этапы видообразования // *Молекуляр. биология*. 2007. Т. 41. № 5. С. 839–851. DOI: 10.1134/S0026893307050093.

Genetic Differentiation among Natural Populations of the Lizard Complex *Darevskia raddei* as Inferred from Genome Microsatellite Marking

A. V. Omelchenko^a, A. E. Girnyk^b, F. A. Osipov^{b, c}, A. A. Vergun^{b, c}, V. G. Petrosyan^a,
F. D. Danielyan^d, M. S. Arakelyan^d, and A. P. Ryskov^b

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: omi@bk.ru

^bInstitute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

^cMoscow State Pedagogical University, Moscow, 119991 Russia

^dYerevan State University, Yerevan, 0025 Republic of Armenia

The article presents the genetic parameters of the populations of lizards of the *Darevskia raddei* complex (*D. raddei nairensis* and *D. raddei raddei*) and the populations of *D. valentini* calculated on the basis of the analysis of variability of 50 allelic variants of the three nuclear genome microsatellite-containing loci of 83 individuals. It was demonstrated that the F_{st} genetic distances between the populations of *D. raddei nairensis* and *D. raddei raddei* were not statistically significantly different from the F_{st} genetic distances between the populations of different species, *D. raddei* and *D. valentini*. At the same time, these distances were statistically significantly higher than the F_{st} distances between the populations belonging to one species within the genus *Darevskia*. These data suggest deep divergence between the populations of *D. raddei raddei* and *D. raddei nairensis* of the *D. raddei* complex and there arises the question on considering them as separate species.

Keywords: species, subspecies, populations, lizards, *Darevskia*, microsatellites, genetic distances, Wright's F_{st} -statistics, F_{st} .