



УДК 598.112.23:575(477+479.25)

Д.Н. Малышева¹, И.Б. Доценко²

¹ Институт биологии гена РАН,
ул. Вавилова 34/5, Москва, 119334, Россия
E-mail: m.dariya@gmail.com

² Национальный научно-природоведческий музей НАН Украины,
ул. Б. Хмельницкого 15, Киев, 01601, Украина
E-mail: icoronella@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ ДНК СКАЛЬНЫХ ЯЩЕРИЦ *DAREVSKIA DAHLI* И *D. ARMENIACA* ИЗ ПОПУЛЯЦИЙ УКРАИНЫ И АРМЕНИИ

Памяти И.С. Даревского и Н.Н. Щербака

Образцы ДНК скальных ящериц, интродуцированных в Житомирской области Украины, соответствуют образцам видов *Darevskia dahli* и *D. armeniaca* из Закавказья (Армения). Результаты анализа образцов ДНК окончательно подтверждают верность определения видовой принадлежности *D. dahli* из популяции ящериц Житомирской области.

Ключевые слова: *Darevskia dahli*, *D. armeniaca*, популяция, партеногенетические виды, интродукция, ДНК, моноклусный PCR-анализ, Украина, Армения, фауна.

Введение

Полвека назад в каньоне реки Тетерев (Житомирская обл., Украина) выдающиеся герпетологи И.С. Даревский и Н.Н. Щербак положили начало эксперименту по акклиматизации и изучению генетических процессов в искусственно созданных изолированных популяциях партеногенетических скальных ящериц, ныне носящих родовое название *Darevskia* (Arribas, 1999), который продолжается до настоящего времени. Светлой памяти этих исследователей посвящается наша статья.

В ранее опубликованных работах об эксперименте по интродукции в каньон р. Тетерев (Житомирская обл.) скальных ящериц из Закавказья (Даревский, Щербак, 1968) сообщалось о нахождении в составе популяции армянских скальных ящериц (*Darevskia armeniaca*) особей другого закавказского партеногенетического вида — скальной ящерицы Даля (*Darevskia dahli*) (Доценко, Даревский, 2005), что поставило вопрос о причинах появления этого вида в данном месте. Рассматривались две возможности их появления: случайный завоз при переселении

© Д.Н. МАЛЫШЕВА, И.Б. ДОЦЕНКО, 2010

с Семеновского перевала (где оба вида обитают симпатрично) (Доценко, Даревский, 2005) или результат скрещивания *D. armeniaca* (у которых время от времени формируются аномальные гаплоидные яйцеклетки) с самцом *Darevskia mixta* из числа переселенных в 1968 г. в то же место (Даревский, 2006) для получения триплоидных гибридов, как то было известно ранее (Даревский и др., 1991; Даревский, Даниелян, 2001), и изучения возможных последствий такой гибридизации в аспекте видообразования.

Для прояснения видовой принадлежности сомнительных экземпляров был принят сравнительный анализ внешнеморфологических признаков популяций ящериц Даля из Закавказья и *D. dahli* из числа интродуцентов в Житомирскую область (Доценко и др., 2009). Результаты дискриминантного и дисперсионного анализа внешней морфологии наглядно показали, что, несмотря на некоторые отличительные признаки, в Житомирской области в составе популяции скальных ящериц существуют действительно *D. dahli*. Чтобы подтвердить это заключение, был выполнен сравнительный анализ ДНК скальных ящериц *D. dahli* и *D. armeniaca* из популяций Закавказья (Армения) и интродуцентов в Житомирскую область (Украина), результаты которого приводятся ниже.

Материалы и методы

Для анализа были использованы 5 экземпляров *D. dahli* и 4 экземпляра *D. armeniaca*, пойманные в Житомирской области в каньоне на левом берегу р. Тетерев близ с. Дениши 1.05.2007 г. (Coll. И.Б. Доценко), а также по 1 особи *D. dahli* из популяций в Армении: Фиолетово, Ваагни (Туманян), Папанино (Дилижан), Дендропарк (Степанаван), собранные в 2005–2006 гг (Coll. Ф.Д. Даниелян и А.В. Асланян).

С помощью локус-специфической PCR (условия постановки реакции стандартные) с использованием пар праймеров, подобранных для локусов Du215 и Du281 (табл. 1), был проведен сравнительный анализ образцов ДНК *D. dahli* и *D. armeniaca* из популяций Украины и Армении. Электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации проводили в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), использовали 40%-ный стоковый раствор акриламида с бис-акриламидом (соотношение акриламида и бис-акриламида — 29 : 1). Приготовление и заливку ПААГ выполняли по стандартной методике. Электрофорез проводили при напряжении 95 V в течение 16 часов. Затем гель окрашивали в растворе бромистого этидия. Полученный результат визуализировали и фиксировали с использованием системы гель-документации BioDocAnalyze (BDАvideo system 30).

Таблица 1. Характеристика праймеров, подобранных к локусам Du215 и Du281

Table 1. Characteristics of primers chosen for loci Du215 and Du281

Локус	Ac no	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Количество нуклеотидов	t отжига, °C
Du215	AY574978	F	5' СААСТАGСАGТАGCTCTCCAGA 3'	22	58° C
		R	5' CCAGACAGGCCCAACTT 3'	18	
Du281	AY442143	F	5' TTGCTAATCTGAATAACTG 3'	19	50° C
		R	5' TCCTGCTGAGAAAGACCA 3'	18	

Примечание. F — прямой праймер; R — обратный праймер.

Результаты и обсуждение

На рисунках 1 и 2 представлены результаты монолокусного PCR-анализа особей *D. armeniaca* и *D. dahli*. Видно, что все исследованные особи гетерозиготны по исследуемым локусам Du215 и Du281 и в популяциях партеновидов они представлены как минимум несколькими аллельными вариантами, различающимися по электрофоретической подвижности продуктов амплификации в интервале 300–200 нуклеотидных пар.

На рисунке 1 представлены результаты сравнительного анализа образцов ДНК особей *D. armeniaca* с *D. dahli* из популяций Украины. Из рисунка видно, что, по электрофоретической подвижности продуктов амплификации локуса Du215, партеновид *D. armeniaca* (дорожки 1–4) отличается от родственного партеновида *D. dahli* (дорожки 5–9). Аналогичные данные были получены при анализе локуса Du281. Показано, что *D. armeniaca* (дорожки 10–13) отличается от *D. dahli* (дорожки 14–18) по электрофоретической подвижности одного из фрагментов на уровне 200 п. н.

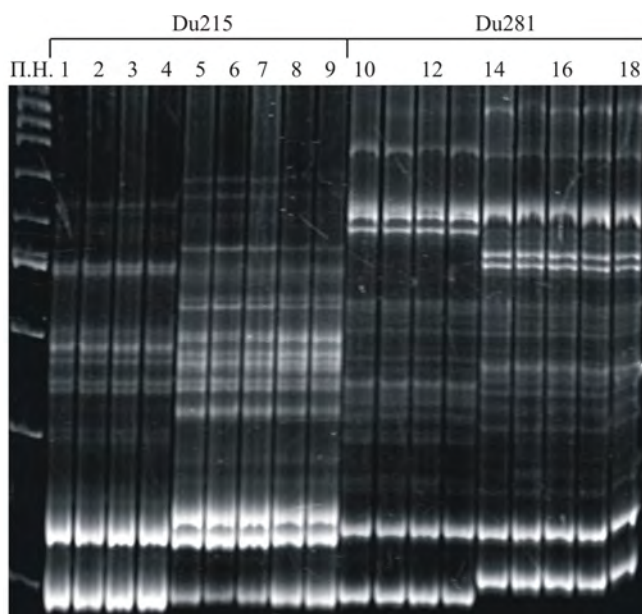


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ продуктов амплификации локуса Du215 и Du281 образцов ДНК *D. armeniaca* (дорожки 1–4 и 10–13) и *D. dahli* (дорожки 5–9 и 14–18) из популяции на Украине (Житомирская обл., р. Тетерев, левый берег). Маркер молекулярного веса 50 bp Ladder (“Fermentas”) и 100 bp Ladder+ (“Fermentas”) с шагом 100 п. н.

Fig. 1. Electrophoresis in polyacrylamide gel of amplification products of locus Du215 and Du281 DNA samples of *D. armeniaca* (lanes 1–4 and 10–13) and *D. dahli* (lanes 5–9 and 14–18) of the population in Ukraine (Zhytomyr region, river Teteriv, left bank). Molecular weight marker 50 bp Ladder (“Fermentas”) and 100 bp Ladder+ (“Fermentas”) in increments of 100 bp

На рисунке 2 представлены результаты сравнительного анализа образцов ДНК особей *D. dahli* из популяции Украины с *D. dahli* из разных популяций Армении. Из рисунка видно, что по электрофоретической подвижности продуктов амплификации локуса Du215 особи *D. dahli* из популяции Украины (дорожки 1–5), в Армении (дорожки 6–9) и локуса Du281 особи *D. dahli* из популяции Украины (дорожки 10–14) и Армении (дорожки 16–18) не отличаются друг от друга.

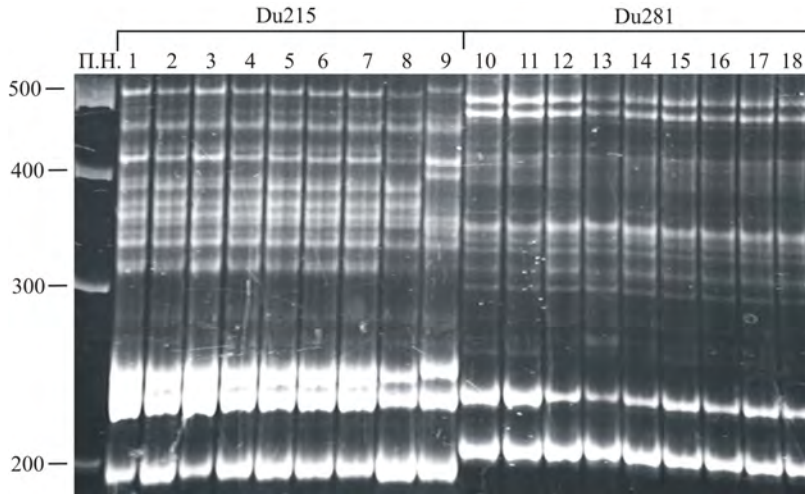


Рис. 2. Электрофорез в ПААГ продуктов амплификации локуса Du215 и Du281 образцов ДНК *D. dahli* (дорожки 1–5 и 10–14) из популяции Украины (Житомирская обл., р. Тетерев, левый берег) и популяций в Армении: Фиолетово (дорожки 6 и 15), Ваагни (Туманян) (дорожки 7 и 16), Папанино (Дилижан) (дорожки 8 и 17), Дендропарк (Степанован) (дорожка 9 и 18). Маркер молекулярного веса 50 bp Ladder (“Fermentas”) и 100 bp Ladder+ (“Fermentas”) с шагом 100 п. н.

Fig. 2. Electrophoresis in polyacrylamide gel electrophoresis of amplification products of locus Du215 and Du281 DNA samples of *D. dahli* (lanes 1–5 and 10–14) of the population of Ukraine (Zhytomyr region, river Teterev, left bank) and the population in Armenia: Fioletovo (lanes 6 and 15), Vahagni (Tumanyan) (lanes 7 and 16), Papanino (Dilijan) (lanes 8 and 17), arboretum (Stepanovan) (lanes 9 and 18). Molecular weight marker 50 bp Ladder (“Fermentas”) and 100 bp Ladder + (“Fermentas”) in increments of 100 bp

Таким образом, результаты анализа образцов ДНК окончательно подтверждают верность определения видовой принадлежности *D. dahli* из популяции ящериц, интродуцированных в Житомирскую область Украины.

Полученные результаты, помимо уточнения видового состава герпетофауны Украины на данный момент, интересны тем, что подтверждают действенность и достаточность морфологического критерия (при условии применения современных методов математической обработки на репрезентативном материале и достаточно широком спектре определительных признаков) для определения видов, или, используя принятое ныне среди систематиков понятие, «морфовидов» (Абрамсон, 2009) рептилий в спорных случаях. Значение такого заключения для исследователей, по разным причинам (редкость исследуемых видов, охранный статус, невозможность получения живых особей и пр.) вынужденных работать главным образом с коллекционными материалами, существенно, поскольку позволяет с высокой степенью достоверности утверждать правильность определения видов на основе соответствия определительным признакам, приводимым в описании. Одновременно с этим следует отметить, что тем большее значение приобретают точность и детальность видового описания, а также тщательность отбора определительных признаков видов (впрочем, те же проблемы, как показано в уже упомянутой работе Н.И. Абрамсон (2009), встают перед систематиками, использующими молекулярные методы анализа ДНК, при выборе молекулярного маркера). В этом отношении рептилии представляют собой классическую группу для строгих систематических исследований, поскольку предоставля-

ют широкий спектр признаков: количественных (меристических), размерных, соотношений и пропорций, а также (во вторую очередь) особенностей окраски и типов рисунка, в совокупности образующих набор легко верифицируемых и поддающихся статистической обработке специфических характеристик. В данном случае видовые описания армянской скальной ящерицы и ящерицы Даля (Даревский, 1967) были составлены столь исчерпывающе и точно, что и спустя более чем 50 лет предоставляют набор определительных признаков, однозначно характеризующих вид, что ныне подтверждается применением не использовавшихся в то время автором методов статобработки данных (дискриминантный и дисперсионный анализ), а также сравнительного анализа образцов ДНК.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-00754-а, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» ГК № 16.740.11.0001 и ГК № 02.740.11.0088, гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-4881.2010.4, гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых МК-4763.2010.4.

*Данная работа была осуществлена авторами благодаря стараниям И.С. Даревского, предложившего подтвердить видовую принадлежность *Darevskia dahli*, обнаруженной среди интродуцентов, на молекулярном уровне и организовавшего совместное исследование сотрудников Института биологии гена РАН и Зоологического музея ННПМ НАН Украины. Авторы также выражают признательность Ф.Д. Даниеляну и А.В. Асланяну (ЕГУ, Ереван, Армения), чьи сборы были использованы для анализа ДНК и сравнения с ДНК интродуцированных ящериц, а также зав. герпетологическими фондами Зоологического музея МГУ В.Ф. Орловой (Москва) за помощь в передаче материалов.*

- Абрамсон Н.И. Молекулярные маркеры, филогеография и поиск критерия разграничения видов // Тр. Зоол. ин-та РАН. — 2009. — Приложение 1. — С. 185–198.
- Даревский И.С. Скальные ящерицы Кавказа. — Л.: Наука, 1967. — 214 с.
- Даревский И.С. Последствия несостоявшейся попытки интродукции двуполого вида скальной ящерицы *Darevskia mixta* (Mehely, 1909) (Sauria, Lacertidae) из Грузии в Житомирскую область Украины // Вестн. зоологии. — 2006. — **40**, № 4 — С. 370.
- Даревский И.С., Даниелян Ф.Д., Розанов Ю.М., Соколова Т.М. Внутриклональное спаривание и его вероятное эволюционное значение в группе партеногенетических видов скальных ящериц рода *Archeolacerta* // Зоол. журн. — 1991. — **7**, вып. 3. — С. 63–73.
- Даревский И.С., Даниелян Ф.Д. Естественная аллотриплоидия у некоторых видов скальных ящериц Кавказа и вероятное эволюционное значение этого феномена: Эволюция, экология, видообразование: Материалы конф. памяти Н.Н. Воронцова (1934–2000) (26–27 дек. 2000). — М., 2001. — С. 131–133.
- Даревский И.С., Щербак Н.Н. Акклиматизация партеногенетических ящериц на Украине // Природа. — 1968. — № 5. — С. 93.
- Доценко И.Б., Даревский И.С. О находке скальной ящерицы Даля *Darevskia dahli* (Darevsky, 1957) в составе популяции армянской скальной ящерицы *Darevskia armeniaca* (Mehely, 1909), интродуцированной на территорию Украины: Материалы Першої конф. УГТ. — К., 2005. — С. 47–50.
- Доценко И.Б., Песков В.Н., Миропольская М.В. Сравнительный анализ внешней морфологии скальных ящериц рода *Darevskia*, обитающих на территории Украины, и их видовая принадлежность // Зб. праць Зоол. музею. — 2008–2009. — № 40. — С. 130–142.
- Arribas O.J. Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archeolacerta Mertens*, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian lacertid radiation // Russian Journal of Herpetology. — 1999. — **6**. — P. 1–22.

Д.Н. Малишева, І.Б. Доценко

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЗРАЗКІВ ДНК СКЕЛЬНИХ ЯЩІРОК *DAREVSKIA DAHLI*
ТА *D. ARMENIACA* З ПОПУЛЯЦІЙ УКРАЇНИ ТА ВІРМЕНІЇ

Зразки ДНК скельних ящірок, що мешкають (інтродуковані) в Житомирській обл., відповідають зразкам видів *Darevskia dahli* і *D. armeniaca* із Закавказзя (Вірменія). Дані аналізу зразків ДНК остаточно підтверджують вірність визначення видової приналежності *D. dahli* з популяції ящірок, інтродукованих в Житомирську обл. України.

Ключові слова: *Darevskia dahli*, *D. armeniaca*, популяція, партеногенетичні види, інтродукція, ДНК, монолокусний PCR-аналіз, Україна, Закавказзя, фауна.

D.N. Malysheva, I.B. Dotsenko

COMPARATIVE ANALYSIS OF *DAREVSKIA DAHLI* AND *D. ARMENIACA*
ROCK LISARDS DNA SAMPLES FROM THE POPULATIONS OF UKRAINE AND ARMENIA

DNA samples of rock lizards inhabiting (as a result of the introduction) in the Zhitomir region, are corresponded to samples of *Darevskia dahli* and *D. armeniaca* from Transcaucasia (Armenia). The results of DNA samples analysis finally confirm the correct determination of *D. dahli*, from the populations of lizards introduced to the Zhytomyr region of Ukraine.

Key words: *Darevskia dahli*, *D. armeniaca*, population, parthenogenetic species, introduction, DNA, PCR-analysis, Ukraine, Transcaucasia, fauna.