

На правах рукописи

МАЛЫШЕВА Дарья Николаевна

«ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ У ОДНОПОЛЫХ И ДВУПОЛЫХ
РЕПТИЛИЙ РОДА DAREVSKIA (СЕМ. LACERTIDAE) И РОДА LEIOLEPIS (СЕМ.
AGAMIDAE)»

Специальность 03.00.26 - молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2006

Работа выполнена в Институте биологии гена РАН

Научные руководители:

чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор Рысков Алексей Петрович

кандидат биологических наук Токарская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор Разин Сергей Владимирович

кандидат биологических наук Потапов Сергей Георгиевич

Ведущая организация: Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Защита диссертации состоится 21 декабря 2006 года в 12 час. на заседании

Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:

119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии

им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан

2006 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд.фарм.наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гипервариабельные мини- и микросателлиты являются универсальной системой молекулярных маркеров, широко используемой в популяционной и эволюционной биологии, геномном маркировании, определении отцовства, а также в медико-генетических исследованиях [Jeffreys et al., 1995; Рысков, 1999]. Эти повторы относятся к наиболее нестабильным участкам генома эукариот, обнаруживая максимально высокие скорости мутаций, известные для генетических локусов [Bois et al., 1998; Ellegren, 2000]. Исследования индивидуальных мини- и микросателлитных локусов показали, что изменения, происходящие в них, по-видимому, весьма разнообразны и зависят от вида живых организмов, типа повторов, аллелей, а также возраста и пола. Однако проблема генезиса мини- и микросателлитных локусов, интенсивно изучаемая на человеке [Xu et al., 2000] и некоторых других двуполых видах [Neff, Gross, 2001], практически не исследована у видов с клональным типом размножения. Изучение этих процессов на однополых видах, используемых в качестве модельных систем, может внести значительный вклад в понимание природы механизмов изменчивости и эволюции гипервариабельных повторов ДНК.

Партеногенетические виды и, в частности, облигатные партеногенетические виды ящериц рода *Darevskia* (сем. Lacertidae)* и партеновиды рода *Leiolepis* (сем. Agamidae), система размножения которых исключает рекомбинацию с мужским геномом, а также активацию яйцеклетки сперматозоидом (гиногенез), являются уникальным объектом для широкого круга биологических и молекулярно-генетических исследований, например, для изучения самого феномена однополого размножения, механизмов детерминации пола, полиплоидии у высших организмов, механизмов регуляции мейоза, оогенеза, эмбриогенеза и ряда других проблем биологии развития, а также для мониторинга генетической изменчивости в локусах с повышенной мутационной активностью.

Клонально размножающиеся позвоночные интересны и достаточно удобны для генетических исследований, так как их клоны генетически стабильны в ряду поколений, что невозможно для животных с обычным типом полового размножения. Естественные популяции партеногенетических видов по этому признаку можно сравнить с инбредными линиями лабораторных животных (мыши, хомяки и др.). Следовательно, использование клональных видов и их разведение в лабораторных условиях позволит избежать ряда скрещиваний, проводимых для получения линий животных с известным и стабильным в ряду поколений генотипом [Cole, 1990]. Одной из центральных проблем в изучении однополых видов позвоночных является определение генетической и клональной изменчивости. Возможными источниками изменчивости и клонального разнообразия в популяциях однополых позвоночных могут быть происхождение клонов от разных особей

основателей и мутации, возникающие в процессе эволюции однополых видов [Parker, 1979; Moritz et al., 1989; Moritz et al., 1992].

Изучение генетической изменчивости, клоно- и видообразования партеногенетически размножающихся видов проводится различными методами, такими, как мультилокусный ДНК-фингерпринтинг, RAPD-анализ, локус-специфический PCR, анализ последовательностей митохондриальной ДНК, а также клонирование и секвенирование различных участков генома, которые являются одними из наиболее эффективных.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы является изучение генетической изменчивости и внутривидовой дифференциации у однополых и двуполых видов Кавказских скальных ящериц рода *Darevskia* (сем. Lacertidae) и рода *Leiolepis* (сем. Agamidae) с помощью комплекса методов молекулярно-генетического анализа.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести ДНК-фингерпринтный анализ семей *D.armeniaca* с целью поиска нестабильных локусов у потомков и установления причин полиморфизма различных микросателлитных маркеров ДНК в популяциях этого и других партеновидов рода *Darevskia*.
2. С помощью локус-специфического PCR выявить ортологичные аллельные варианты локуса Du 215, обнаруженные ранее у *D.unisexualis*, в популяциях родственного партеновида *D.armeniaca* и двуполых родительских видов *D.mixta* и *D.valentini*.
3. Изучить генетическую изменчивость различных микросателлитных маркеров в популяциях однополых (*L.guentherpetersi*) и двуполых (*L.reevesii*) ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis*, ранее не исследованных с помощью ядерных маркеров ДНК.
4. Охарактеризовать степень внутривидовой дифференциации партеногенетических ящериц *D.rostombekovi* с помощью RAPD-маркеров.
5. Провести сравнительный анализ последовательностей митохондриального гена *cyt b* ящериц *D.rostombekovi* из Северо-Западной Армении, изолированной популяции побережья озера Севан и двуполых видов (*D.raddei* и *D.nairensis*) из разных популяций с целью определить происхождение ранее не исследованной популяции побережья озера Севан партеновида *D.rostombekovi*.

*В настоящее время все кавказские виды группы "*Lacerta saxicola*" выделены в новый таксон *Darevskia gen. nov.* [Arribas, 1999].

Научная новизна работы. В настоящей работе впервые: 1) получены данные о вкладе герминальных и соматических мутаций в генотипическое и клональное разнообразие партеновида *D.armeniaca*; 2) исследован популяционный полиморфизм и определена структура аллельных вариантов ортологичного локуса Du 215 (arm) у *D.armeniaca* и двуполых родительских видов (*D.mixta* и *D.valentini*); 3) впервые с помощью ядерных мультилокусных маркеров ДНК исследованы однополые (*L.guentherpetersi*) и двуполые (*L.reevesii*) ящерицы рода *Leiolepis*, и обнаружен высокий уровень полиморфизма локусов, содержащих (GATA)_n мотивы; 4) с помощью RAPD-маркеров показана внутривидовая дифференциация у *D.rostombekov*; 5) по данным анализа митохондриального генома установлено общее происхождение всех исследованных особей *D.rostombekovi* из разных популяций, и, кроме того, обнаружен новый гаплотип, отличающийся транзицией С→Т типа у особей из популяции побережья озера Севан.

Практическое значение работы. Полученные в настоящей работе результаты раскрывают причины появления полиморфных локусов в популяциях однополых ящериц, вносят существенный вклад в понимание природы мутационной изменчивости и механизмов клоно- и видообразования у однополых видов рептилий. Данные о структуре участков ядерного и митохондриального генома могут использоваться для геномного маркирования рептилий, в сравнительной и эволюционной геномике однополых и двуполых видов рептилий, а также для мониторинга генетической изменчивости в локусах с повышенной мутационной активностью. Результаты исследования могут найти применение при решении отдельных проблем биобезопасности и экологии, для охраны однополых видов позвоночных, оценке геномных различий у животных, клонированных лабораторным путем.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: III съезд биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), XV и XVIII Зимняя Международная Молодежная Научная Школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии” (Москва, 2003 и 2006 гг.), International conference “Molecular genetics of eucaryotes” (Moscow, 2003), 12th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica (Saint-Petersburg, 2003), International conference “Advanced in molecular cell biology” (Moscow, 2004), 9-ая Международная Пушчинская Школа-Конференция Молодых Ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2005), International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution” (Yerevan, 2005), 9th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (France, 2005) и на Международной конференции

“Генетика в России и Мире”, посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (Москва, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 5 статей и 10 тезисов докладов и материалов конференций.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 146 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов, списка литературы (227 источников) и раздела благодарностей. Работа включает в себя 12 таблиц и проиллюстрирована 32 рисунками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

I. Внутривидовой полиморфизм ядерных маркеров ДНК партеногенетической Кавказской скальной ящерицы *D.armeniaca* и двуполых родительских видов *D.mixta* и *D.valentini*

I.1. ДНК-фингерпринтный анализ популяционных, семейных и тканевых образцов ДНК *D.armeniaca*

В настоящей работе впервые обнаружены мутации у партеногенетических потомков *D.armeniaca* по локусам, содержащим (CT)_n, (CTG)_n, (GATA)_n, (GACA)_n, (GGCA)_n и (CAC)_n мотивы. Всего было исследовано 43 семьи (131 потомок) и 39 популяционных образцов из 8 популяций Армении.

На **рисунке 1** в качестве примера приведены данные ДНК-фингерпринтного анализа семей *D.armeniaca* при использовании (GACA)₄ пробы. Проба (GACA)₄ выявляла высокий уровень полиморфизма в популяциях (**Рис. 1а**) и мутации в семьях (**Рис. 1б**, дорожки **2, 10 – 13** и **15 – 18**). На **рисунке 1б** (дорожки **3 – 8**) в качестве примера приведена одна семья без мутаций.

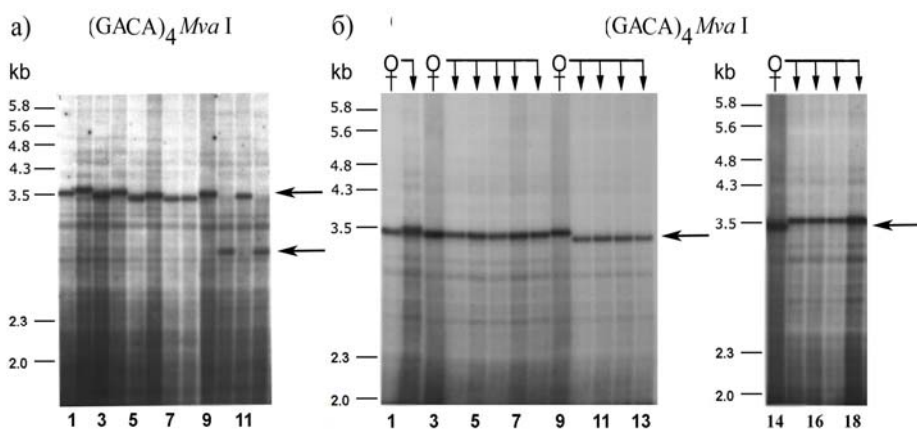


Рисунок 1. Фингерпринтный анализ популяций (**а**) и семей (**б**) *D.armeniaca* с использованием (GACA)₄ пробы. Особи для анализа были взяты из популяций на Украине и в Армении. Полиморфные и мутантные фрагменты указаны стрелками. В

качестве маркера молекулярного веса (т.п.н.) использовали рестрикты ДНК фага λ.

Частота мутаций составила 14.5% на потомка и оценивалась как количество мутантных потомков (19) деленное на общее количество исследованных потомков (131). Частота мутаций на потомка на фрагмент оценивалась как $(19/18.4/131) = 0.008$, где 18.4 среднее число $(GACA)_n$ фингерпринтных полос на особь [Vois et al., 1998] (**Таблица 1**).

В случаях использования $(GATA)_4$, $(GACA)_4$ и $(GGCA)_4$ олигонуклеотидных проб мутантные фингерпринтные фенотипы всех потомков из одной семьи были одинаковы и отличались от материнского, а также присутствовали в популяционной выборке как полиморфные локусы, поэтому можно предположить, что мутации происходят в герминальных клетках. Во всех исследованных случаях для $(CT)_9$ и $(CTG)_5$ проб фингерпринтные профили отличались подвижностью одного фрагмента ДНК. Частота мутаций, выявляемая с помощью всех использованных зондов приведена в **таблице 1**. Вероятно, для локусов, содержащих $(CTG)_n$ и $(CT)_n$ мотивы, это предварительная оценка из-за малой выборки потомков. Высокая частота мутаций может объясняться не только изменениями в герминальных клетках, но также и в соматических, которые хорошо известны у двуполых видов [Mahtani, Willard, 1993; Gibbs et al., 1993; Vois et al., 1998] и впервые обнаружены у однополых ящериц *D.unisexuialis* [Рысков и др., 2000; Tokarskaya et al., 2004].

Все микросателлитные маркеры выявляли мутантные фингерпринтные фенотипы у потомков, но наиболее высокий уровень мутаций (98,47%) (**Таблица 1**) был обнаружен при использовании $(CAC)_5$ микросателлитной пробы. В этом случае 129 партеногенетических потомков в 42 исследованных семьях отличались от своих матерей (**Рис. 2б**, дорожки 2 – 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15 – 18, 20, 21) в зоне электрофоретического разрешения между 5.6 и 4.8 т.п.н. Только в одной семье не было обнаружено различий между матерью и потомками. Частота мутаций на потомка на фрагмент составила 0.049 (**Таблица 1**). В отличие от других микросателлитсодержащих локусов $(CAC)_n$ не был полиморфным в партеногенетических популяциях (**Рис. 2а**).

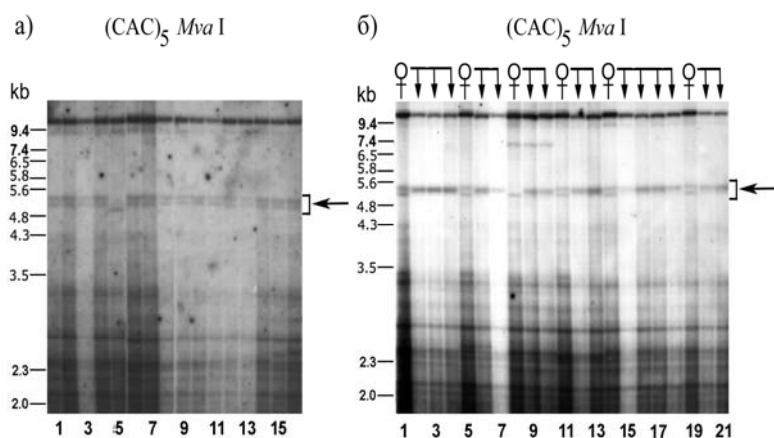


Рисунок. 2. Фингерпринтный анализ популяций (**а**) и семей (**б**) *D.armeniaca* с использованием $(CAC)_5$ пробы. Особи для анализа были взяты из популяций на Украине и в Армении. Полиморфные и мутантные фрагменты указаны квадратными скобками и стрелками. В качестве маркера молекулярного веса (т.п.н.) использовали рестрикты ДНК фага λ .

Анализ различных тканей и органов 3 взрослых ящериц выявил соматический мозаицизм по локусам, содержащим $(CAC)_n$ мотивы (Рис. 3). Высокий уровень мутаций, различие фингерпринтных паттернов тканей и органов, взятых у одной особи, и низкий уровень популяционного полиморфизма указывают на соматическую природу мутаций.

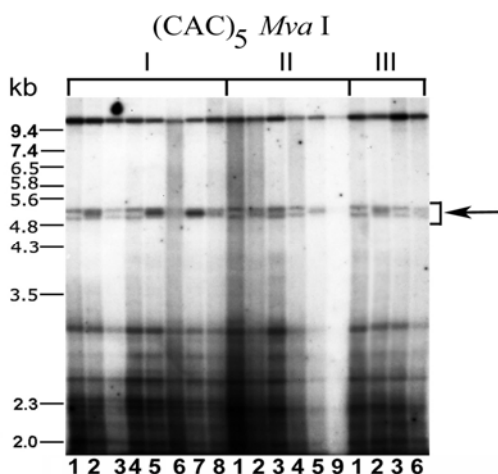


Рисунок 3. Фингерпринтный анализ тканей и органов 3-х взрослых ящериц *D. armeniaca* (I, II, III) с использованием $(CAC)_5$ олигонуклеотидной пробы: кровь – 1, печень – 2, легкие – 3, яичники – 4, сердце – 5, кишечник – 6, мозг – 7, желчный пузырь – 8, мышцы – 9. Взрослые ящерицы были взяты из популяций в Армении. Образцы ДНК обрабатывали рестриктазой *Mva* I. Полиморфные фрагменты, обнаруженные в разных тканях, указаны стрелкой и квадратными скобками. В качестве маркера молекулярного веса (т.п.н.) использовали рестрикты ДНК фага λ .

Таблица 1. Анализ изменчивости микросателлитных маркеров ДНК у партеногенетических потомков *D. armeniaca*.

Сочетание Зонд/рестриктаза*	Кол-во исследованных потомков	Кол-во мутантных потомков	Общее число мутантных фрагментов	Среднее число фрагментов на особь (SE)	Частота мутаций на потомка (%)	Частота мутаций на потомка на фрагмент ^a
$(CT)_9/Bsu$ RI	7	1	1	30 (0.2)	14.3	0.048
$(CTG)_5/Mva$ I	64	2	2	26 (0.4)	3.13	0.012
$(GACA)_4/Mva$ I	131	19	19	18.4 (0.4)	14.5	0.008
$(GGCA)_4/Mva$ I	131	19	27	16.2 (0.12)	17.56	0.013
$(GATA)_4/Mva$ I	131	17	30	24.7 (0.8)	12.98	0.009
$(CAC)_5/Mva$ I	131	129	129	20.5 (0.1)	98.47	0.049

*При всех сочетаниях зонд/рестриктаза учитывались только хорошо различимые и четко воспроизводимые при повторной гибридизации фрагменты.

^a – Частота мутаций на потомка на фрагмент рассчитывалась согласно Bois et al., 1998, как описано ранее.

Приведенные оценки мутационной изменчивости фрагментов ДНК, содержащих $(CT)_n$, $(CTG)_n$, $(GGCA)_n$, $(GATA)_n$, $(GACA)_n$ и $(CAC)_n$ мотивы, показали довольно высокую скорость мутаций у *D. armeniaca*, сравнимую с таковой у двуполовых видов [Weber, Wong, 1993; Brohede et al., 2002; Gardner et al., 2000; Ellegran, 2000].

Данные о высокой скорости мутаций у *D. armeniaca* получены впервые в настоящей работе и свидетельствуют о значительном вкладе герминальных и соматических мутаций в генотипическое и клональное разнообразие однополых популяций *D. armeniaca* и других партеногенетических видов рода *Darevskia*.

1.2. Локус-специфический PCR-анализ внутри- и межпопуляционного полиморфизма локуса Du 215 (arm) *D.armeniaca* и двуполовых родительских видов *D.mixta* и *D.valentini*

С помощью локус-специфического PCR-анализа, используя пары праймеров, подобранные для локуса Du 215 *D.unisexuales* [Корчагин и др., 2004], проводили изучение аллельного полиморфизма ортологичного локуса в 15 популяциях из Армении родственного партеновида *D.armeniaca* (n = 127). В популяциях *D.armeniaca* были выявлены аллельные варианты локуса Du 215 (ортологичный локус обозначен как Du 215 (arm)) и определены их различия на уровне первичной структуры ДНК.

1.2.1. Внутри- и межпопуляционный полиморфизм видов рода *Darevskia* по локусу Du 215 (arm)

На рисунке 4 представлены результаты монолокусного PCR-анализа особей *D.armeniaca*. Видно, что по локусу Du 215 (arm) все особи являются гетерозиготами, и в популяциях партеновида локус Du 215 (arm) представлен, как минимум, тремя аллельными вариантами, различающимися по электрофоретической подвижности продуктов амплификации в интервале 200 – 300 н.п., и исследованные популяции отличались между собой по частоте встречаемости этих аллельных вариантов.

В связи с тем, что *D.armeniaca* имеет гибридное происхождение, аллельные варианты локуса Du 215 (arm) у *D.armeniaca* могли перейти от предковых двуполовых видов. На рисунке 5 представлены результаты амплификации локуса Du 215 (arm) особей двуполовых видов *D.mixta* и *D.valentini*. Видно, что исследованные особи вида *D.mixta* являются гомозиготами, а особи *D.valentini* – гетерозиготами. Также можно предположить, что один из аллелей одинаков у обоих видов.

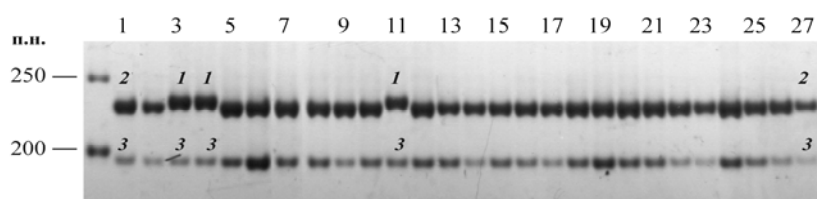


Рисунок 4. Электрофорез в ПААГ продуктов амплификации образцов ДНК *D.armeniaca* из популяций: Такярлу (1, 2), Украинская

популяция (3, 4), Артик (5, 6), Лчач (7), Лчашен (8), Гош (9), Алаверды (10, 11), Меградзор (12, 13), Медведь-гора (14, 15), Пушкинский перевал (16, 17), Семеновский перевал (18, 19), Папанино (20, 21), Теж (22, 23), Степанаван (24, 25), Кутчак (26, 27). Маркер молекулярного веса 50 bp Ladder “Fermentas” с шагом 50 п.н. Цифрами указаны аллельные варианты.

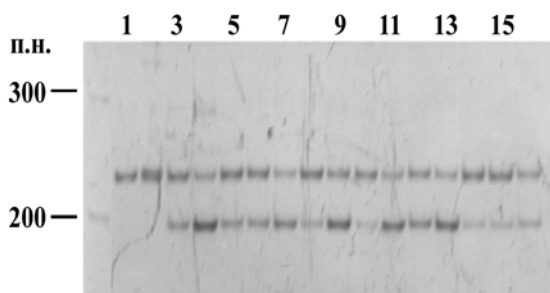


Рисунок 5. Электрофорез в ПААГ ПЦР-продуктов локуса Du 215 особей *D.mixta* из популяции Ахалдаба в Грузии (1 – 2) и *D.valentini* из популяций в Армении: Лчашен (3 – 6), гора Теж – Памбакский хребет (7 – 11), гора Адис – Гегамский хребет (12 – 16). Маркер молекулярного веса 100 bp+ Ladder “Fermentas” с шагом 100 п.н.

1.2.2. Секвенирование локуса Du 215 (arm) у однополого вида *D.armeniaca* и двуполых видов *D.mixta* и *D.valentini*

Для изучения молекулярной природы аллельного полиморфизма локуса Du 215 (arm) в популяциях *D.armeniaca* и двуполых родительских видов *D.valentini* и *D.mixta* было проведено секвенирование PCR-продуктов, соответствующих трем его аллельным вариантам. Анализ нуклеотидных последовательностей аллелей Du 215 (arm) показал, что их микросателлитные кластеры имеют сложное строение. Аллели 1 и 2 Du 215 (arm) содержат в своем составе как (GATA)_n, так и (GACA)_n кластеры и отличаются друг от друга на одно мономерное GATA-звено. Аллель 3 Du 215 (arm) не содержит (GACA)_n повторов и имеет более короткий (GATA)_n кластер. Следует также указать на вариабельность концевых участков микросателлитного кластера у аллелей локуса Du 215 (arm), которая выражается в наличии или отсутствии мономера GACA у 5'-конца и разной копийности GCAA-звена у 3'-конца соответствующих вариантов данного локуса. Кроме того, аллели 1 – 3 локуса Du 215 (arm) друг от друга отличаются точковыми мутациями типа транзиций и трансверсий, расположенными на фиксированных расстояниях (–19, –38 и –58 н.п.) от начала микросателлитного кластера. При этом точковые мутации образуют два гаплотипа: T-G-C (аллели 1 и 2) и A-C-T (аллель 3). Доказательством того, что локус Du 215 (arm) – ортолог локуса Du 215, является идентичность нуклеотидных последовательностей, фланкирующих микросателлитный кластер, у аллельных вариантов Du 215 (arm) и клона Du 215 родственного партеновида *D.unisexuialis* (GenBank Ac No AY574978) (Рис. 6).

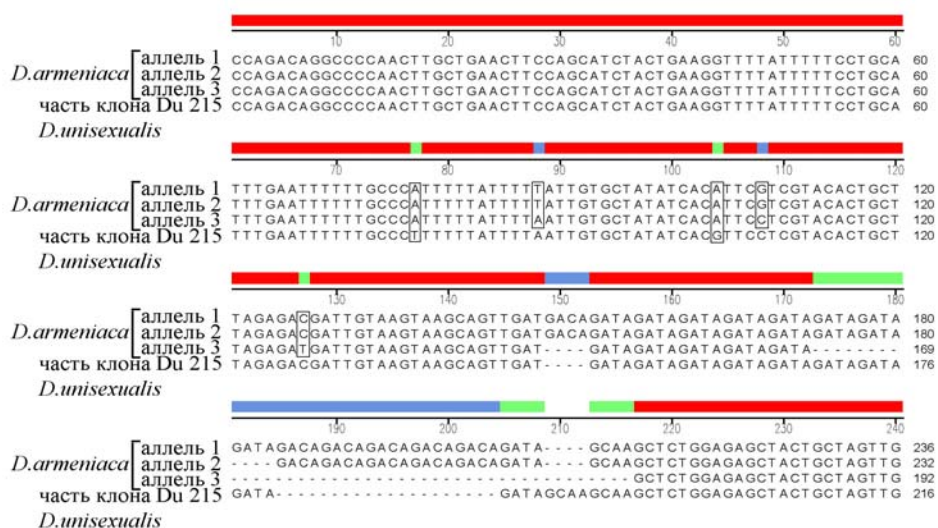


Рисунок 6. Сравнение нуклеотидных последовательностей трех аллельных вариантов локуса Du 215 (arm) *D.armeniaca* между собой и с нуклеотидной последовательностью части клона Du 215 родственного партеновида *D.unisexuialis*. Совпадающие участки выделены красным цветом на полосе сверху. Однуклеотидные замены выделены рамкой.

На рисунке 7 представлены нуклеотидные последовательности продуктов амплификации локуса Du 215 (arm) у *D.armeniaca* и бисексуальных видов *D.mixta* и *D.valentini*. Из рисунка видно, что аллельный вариант, присутствующий и у *D.mixta* и у *D.valentini* (233 п.н.), идентичен аллельному варианту 2, обнаруженному у *D.armeniaca*. Второй аллельный вариант, не обнаруженный у *D.mixta* и встречающийся только у *D.valentini* (193 п.н.), по своим структурным характеристикам и составу микросателлитного кластера оказался таким же, как аллельный вариант 3, выявленный у *D.armeniaca*.



Рисунок 7. Сравнение нуклеотидных последовательностей трех аллельных вариантов локуса Du 215 (arm) *D.armeniaca* с нуклеотидными последовательностями аллельных вариантов локуса Du 215 у двуполовых родительских видов *D.mixta* и *D.valentini*. Совпадающие участки выделены красным цветом на полосе сверху. Однонуклеотидные замены выделены рамкой.

В данной работе впервые получена информация о молекулярной природе аллельного полиморфизма одного из микросателлитных локусов у партеновида *D.armeniaca*. Партеновиды *D.armeniaca* и *D.unisexuales* имеют один общий родительский бисексуальный вид *D.valentini* [MacCulloch et al., 1995]. Данные по структуре аллельных вариантов ортологичных локусов Du 215 и Du 215 (arm) позволяют на новом уровне изучать филогенетические связи как между партеновидами, так и родительскими формами и в дальнейшем оценить степень дивергенции этих видов.

II. Изучение генетической изменчивости однополых (*L.guentherpetersi*) и двуполых (*L.reevesii*) ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis* методом ДНК-фингерпринтного анализа

С помощью мультилокусного ДНК-фингерпринтинга с использованием микросателлитных проб (CAC)₅, (GACA)₄, (GGCA)₄ и (GATA)₄ впервые изучена

внутривидовая изменчивость ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis* (двуполого вида *L.reevesii* и триплоидного партеногенетического вида *L.guentherpetersi*).

На **рисунке 8 (а, б)** в качестве примера представлены данные блот-гибридизации с использованием $(GACA)_4$ и $(CAC)_5$ микросателлитных проб для двуполого *L.reevesii* и однополого *L.guentherpetersi* видов. Независимо от системы анализа, каждая особь двуполого вида *L.reevesii* обладает четким индивидуум-специфичным профилем маркеров ДНК, а особи партеногенетического вида *L.guentherpetersi* характеризуются практически идентичным (видоспецифическим) фингерпринтным профилем.

Количественные оценки изменчивости мультилокусных микросателлитных маркеров однополого (**Таблица 2**) и двуполого (**Таблица 3**) видов рода *Leiolepis* представлены в виде таблиц. Таким образом, внутривидовая изменчивость, оцененная по среднему значению индекса сходства у однополого вида *L.guentherpetersi*, оказалась значительно ниже, чем у двуполого вида *L.reevesii* ($t = 5.93$; $P = 2.1 \times 10^{-5}$).

Совершенно неожиданными оказались результаты фингерпринтного анализа образцов ДНК партеновида *L.guentherpetersi* при использовании в качестве гибридизационной пробы $(GATA)_4$ (**Рис 8в**). Видно, что партеногенетические ящерицы *L.guentherpetersi* высокополиморфны по локусам, детектируемым $(GATA)_4$ пробой, причем каждая отдельная особь партеновида обладает четким индивидуум-специфичным профилем ($S = 0.35$), что обычно характерно только для двуполых видов животных ($P = 0.74$) (**Таблицы 2 и 3**).

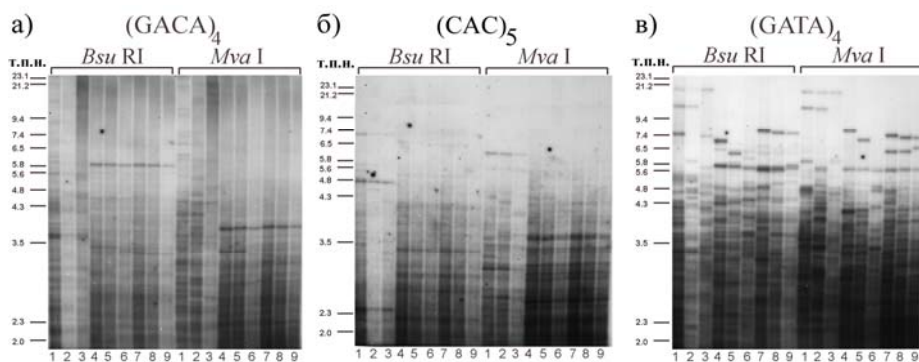


Рисунок 8. ДНК-фингерпринтный анализ особей двуполого вида *L.reevesii* (дорожки 1 – 3) и партеногенетического вида *L.guentherpetersi* (дорожки 4 – 9) с использованием различных ДНК-проб. В

качестве маркера молекулярного веса (т.п.н.) использовали рестрикты ДНК фага λ .

В настоящей работе впервые показано, что вид *L.guentherpetersi* характеризуется мономорфностью ДНК-фингерпринтных спектров по локусам, детектируемым $(GACA)_4$, $(GGCA)_4$ и $(CAC)_5$ ($S = 0.96$), в отличие от индивидуально-специфических профилей ящериц двуполого предполагаемого родительского вида *L.reevesii* ($S = 0.6$; $P < 0.001$). Генетическая однородность триплоидных особей *L.guentherpetersi* по этим локусам является одним из доказательств партеногенетической природы этого вида. Установлено, что изменчивость *L.guentherpetersi* по $(GATA)_n$ маркерам значительно выше, чем по другим маркерам ДНК ($S = 0.35$; $P = 3.08 \times 10^{-11}$) и сопоставима с изменчивостью $(GATA)_n$ маркеров ДНК у двуполого

вида *L.reevesii* ($P = 0.74$). Природа высокого полиморфизма $(GATA)_n$ содержащих локусов у *L.guentherpetersi* остается неясной и, по-видимому, связана с их повышенной нестабильностью, которая может быть выявлена при семейном анализе.

Таблица 2. Сравнительный анализ изменчивости микросателлитных маркеров ДНК у однополого вида ящериц *L.guentherpetersi*.

Сочетание зонда и рестриктазы	Число особей N	Среднее число фрагментов на особь n (SE)	Среднее значение индекса сходства S(SE)	95%-доверительный интервал
$(CAC)_5 - Bsu$ RI	6	20	0.97(0.007)	0.96 - 0.99
$(GACA)_4 - Bsu$ RI	6	20	0.95(0.013)	0.93 - 0.97
$(GGCA)_4 - Bsu$ RI	6	16	0.98(0.008)	0.97 - 0.99
Объединенная по трем зондам – <i>Bsu</i> RI	6	49	0.97(0.005)	0.96 - 0.98
$(CAC)_5 - Mva$ I	6	26	0.97(0.007)	0.96 - 0.98
$(GACA)_4 - Mva$ I	6	27.5(0.245)	0.92(0.015)	0.9 - .95
$(GGCA)_4 - Mva$ I	6	9	1	1
Объединенная по трем зондам – <i>Mva</i> I	6	62.5(0.245)	0.95(0.009)	0.94- 0.97
Объединенная по трем зондам <i>Bsu</i> RI и по трем зондам <i>Mva</i> I	6	111.5(0.245)	0.96(0.006)	0.95 - .97
$(GATA)_4 - Bsu$ RI	6	28.5(0.374)	0.38(0.034)	0.32- 0.44
$(GATA)_4 - Mva$ I	6	26.8(1.7)	0.31(0.045)	0.23 - 0.39
Объединенная по <i>Bsu</i> RI и <i>Mva</i> I	6	55.3(2)	0.35(0.036)	0.29 - .41

Таблица 3. Сравнительный анализ изменчивости микросателлитных маркеров ДНК у двуполого вида ящериц *L.reevesii*.

Сочетание зонда и рестриктазы	Число особей N	Среднее число фрагментов на особь n (SE)	Среднее значение индекса сходства S(SE)	95%-доверительный интервал
$(CAC)_5 - Bsu$ RI	3	19(1.4)	0.67 (0.067)	0.47 - 0.87
$(GACA)_4 - Bsu$ RI	3	31.7(2.273)	0.66 (0.03)	0.57 - .75
$(GGCA)_4 - Bsu$ RI	3	23.3(1.8)	0.60(0.06)	0.44 - 0.76
Объединенная по трем зондам – <i>Bsu</i> RI	3	74(4.3)	0.65 (0.03)	0.56 - 0.73
$(CAC)_5 - Mva$ I	3	21.3 (2.2)	0.63(0.12)	0.29 - 0.989
$(GACA)_4 - Mva$ I	3	32.6(2.3)	0.58(0.02)	0.53 - 0.64
$(GGCA)_4 - Mva$ I	3	23(2.1)	0.46(0.01)	0.44 - 0.49
Объединенная по трем зондам- <i>Mva</i> I	3	77(4.4)	0.56(0.03)	0.48 - 0.65
Объединенная по трем зондам <i>Bsu</i> RI и по трем зондам <i>Mva</i> I	3	151(7.9)	0.6(0.02)	0.56 - 0.65
$(GATA)_4 - Bsu$ RI	3	33(1.9)	0.49(0.04)	0.37 -0.62
$(GATA)_4 - Mva$ I	3	36(2.8)	0.43(0.07)	0.21 - 0.64
Объединенная по <i>Bsu</i> RI и <i>Mva</i> I	3	69(3.7)	0.46(0.06)	0.29-0.62

III. Внутривидовая дифференциация партеногенетической ящерицы Кавказа *D.rostombekovi* по данным анализа ядерного и митохондриального генома

III.1. Изучение изменчивости RAPD-маркеров в популяциях *D.rostombekovi*

В процессе подбора условий реакции для проведения популяционного анализа были выбраны 5 случайных праймеров со стабильным, хорошо воспроизводимым в повторных экспериментах профилем амплификации. RAPD-спектры *D.rostombekovi* характеризуются видоспецифичностью, низким полиморфизмом маркерных фрагментов ДНК по сравнению с двуполовыми видами рода *Darevskia* [Ryabinina et al, 1999] и преобладанием инвариантных зон для праймеров 45, 343 и SB2. Наиболее полиморфные спектры амплификации ДНК получены с праймерами 29 и 92. На **рисунке 9** в качестве примера представлен спектр амплификации последовательностей ДНК *D.rostombekovi* из разных популяций, полученный при использовании праймера 92.

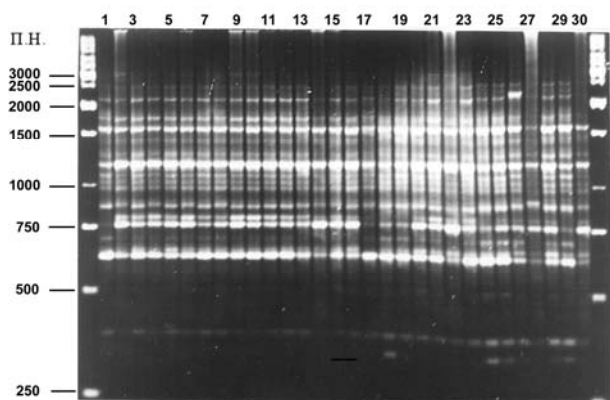


Рисунок 9. Изменчивость RAPD-маркеров в популяциях *D.rostombekovi*: Спитак (1 – 9), Гош (10 – 13), Папанино (14 – 25), Загалу (26 – 30), выявляемая праймером 92. Маркер молекулярных масс: 1kb ДНК маркер “Fermentas”.

Изменчивость RAPD-маркеров оценивали по вариабельности числа амплифицированных фрагментов ДНК. Максимальная изменчивость отмечается в популяциях Папанино и Спитак, а наименьшая изменчивость в популяции Гош. Внутрипопуляционная изменчивость RAPD-маркеров оценивалась по среднему значению индексов сходства, которые варьировали в пределах от 0.931 до 0.98 (**Таблица 4**). Анализ показал, что изменчивость RAPD-маркеров внутри каждой популяции невелика и сравнима с внутрипопуляционной изменчивостью мини- и микросателлитных маркеров ДНК ($P > 0.05$) [Мартиросян и др., 2002].

Для оценки генетических различий между популяциями *D.rostombekovi* использовали множественный сравнительный анализ, основанный на модифицированном методе Холмса теста Бонферрони [Петросян и др., 2003]. Проведенные множественные попарные сравнения средних межпопуляционных индексов сходства выявили значительные различия ($P < 0.05$) среди исследованных популяций (**Таблица 5**).

Таблица 4. Изменчивость RAPD-маркеров, наблюдаемая в популяциях *D.rostombekovi*^а.

Номер популяции	Среднее число RAPD-фрагментов на особь n (SE) _n (SE)	Число переменных RAPD-фрагментов на особь			Среднее значение индекса сходства S (SE)	95% доверительный интервал значений S
		Инв ^б	Мин ^в	Макс ^г		
1 (Спитак)	97.8 (0.46)	86	95	101	0.959 (0.004)	0.949 – 0.971
2 (Папанино)	100 (0.703)	83	95	104	0.931 (0.004)	0.925 – 0.938
3 (Гош)	97.25 (0.289)	94	97	98	0.98 (0.004)	0.97 – 0.989
4 (Загалу)	101.8 (0.418)	93	100	105	0.96 (0.006)	0.949 – 0.971

а – Значения, приведенные для популяционных образцов, оценивались с помощью матрицы данных, полученной путем суммирования данных матриц, составленных по каждому из пяти олигонуклеотидных праймеров.

б – Число одинаковых фрагментов на особь.

в,г – Минимальное и максимальное число фрагментов на особь соответственно.

Таблица 5. Множественный сравнительный анализ средних значений межпопуляционных индексов сходства, основанный на модифицированном методе Холмса теста Бонферрони ($\alpha = 0.10$).

Попарные сравнения 1	Попарные сравнения 2	T-критерий	P-значение
S ₃₋₄ (0.917)	S ₂₋₃ (0.934)	3.83	1.8x10 ⁻⁴
S ₃₋₄ (0.917)	S ₁₋₃ (0.929)	2.43	1.7x10 ⁻²
S ₃₋₄ (0.917)	S ₁₋₂ (0.953)	6.9	9.9x10 ⁻¹⁰
S ₂₋₄ (0.9)	S ₂₋₃ (0.934)	7.59	3.9x10 ⁻¹²
S ₂₋₄ (0.9)	S ₁₋₃ (0.929)	5.8	9.5x10 ⁻⁸
S ₂₋₄ (0.9)	S ₁₋₂ (0.953)	10.02	1.1x10 ⁻¹⁵
S ₁₋₄ (0.918)	S ₂₋₃ (0.934)	4.52	2.2x10 ⁻⁵
S ₁₋₄ (0.918)	S ₁₋₃ (0.929)	2.64	1.1x10 ⁻²
S ₁₋₄ (0.918)	S ₁₋₂ (0.953)	7.74	2x10 ⁻⁹

По данным RAPD-анализа исследованных особей *D.rostombekovi* можно разделить на две группы: в первую попадают особи из популяции побережья озера Севан, а во вторую – особи из популяций Северной Армении. Генетические различия между двумя группами и популяциями показаны с помощью UPGMA-дендрограммы (Рис. 10).

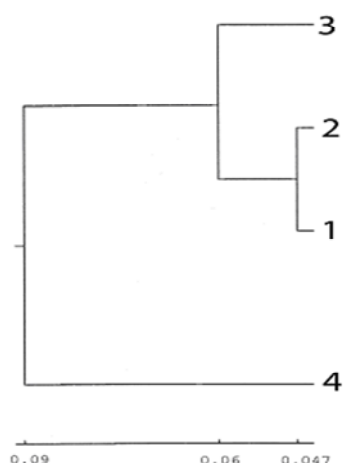


Рисунок 10. Генетические различия между популяциями *D.rostombekovi*. Дендрограмма построена на основе индексов различия между особями отдельных популяций по объединенной матрице данных методом UPGMA. Популяции Северной Армении (Спитак – 1, Папанино – 2, Гош – 3) и популяция побережья озера Севан (Загалу – 4) ($P < 0.05$).

Приведенные оценки внутри- и межпопуляционных сравнений указывают на низкую внутривидовую изменчивость индивидуальных популяций *D.rostombekovi* и одновременно значительные генетические отличия между популяциями Северной Армении и реликтовой, географически изолированной популяцией побережья оз. Севан. В связи с полученными данными возникает вопрос о происхождении особей из популяции побережья озера Севан.

III.2. Анализ митохондриального гена цитохрома *b* (*cyt b*) партеновида *D.rostombekovi* и двуполовых видов *D.raddei* и *D.nairensis*

Проведенные ранее исследования рестрикционного полиморфизма митохондриальной ДНК [Moritz et al., 1992] и нуклеотидного анализа гена цитохрома *b* (1044 п.н.) трех северо-западных популяций партеновида *D.rostombekovi* и родственных двуполовых видов этого рода однозначно показали, что особи из северо-западных популяций (Спитак, Гош и Папанино) имеют единое происхождение от материнского вида *D.raddei* из одной из южных армянских популяций – популяции Егегнадзор (39°45'N, 045°08E) [Fu et al., 2000].

Для изучения филогенетических связей и происхождения популяций *D.rostombekovi* Северо-Западной Армении и побережья озера Севан (Загалу) было проведено секвенирование гена *cyt b* (1044 п.н.). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 18 особей *D.rostombekovi* из четырех популяций Армении выявил нуклеотидную замену – транзицию С→Т в первой кодон-позиции (положение 535 п.н.) у особей из популяции Загалу по сравнению с особями других исследованных популяций.

Все полученные нуклеотидные последовательности гена цитохрома *b* изученных особей являются функциональными, так как не содержат преждевременных стоп-кодонов в пределах самого гена. В полученных аминокислотных последовательностях (348 аминокислот) ни одна из позиций не оказалась вариабельной. Это свидетельствует о том, что обнаруженная нуклеотидная замена является синонимичной и не приводит к замене аминокислоты (Лейцин – Leu в позиции 179 от 5' конца L-цепи).

На **рисунке 11** представлена дендрограмма, построенная на основании анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей гена *cyt b*, полученных в настоящей работе и данных, взятых из работы Fu и соавторов [Fu et al., 2000]. Результаты анализа дендрограммы показали, что популяция озера Севан образует единую группу с другими популяциями *D.rostombekovi* (0.001), которая наиболее близко кластеризуется с популяцией материнского вида *D.raddei* из Егегнадзора (0.0716).

На основании дендрограммы, с помощью программы MEGA 3 было рассчитано приблизительное время возникновения партеновида *D.rostombekovi* от материнского вида

D.raddei из популяции в Егегнадзоре (11 684 лет назад), что соответствует предполагаемому времени возникновения однополых видов рода *Darevskia* и вида *D.armeniaca* в частности [Moritz et al., 1992; Darevsky, 1993]. Соответственно приблизительное время дивергенции особей из популяции Загалу от особей из популяций Северо-Западной Армении (1 500 – 2 000 лет назад).

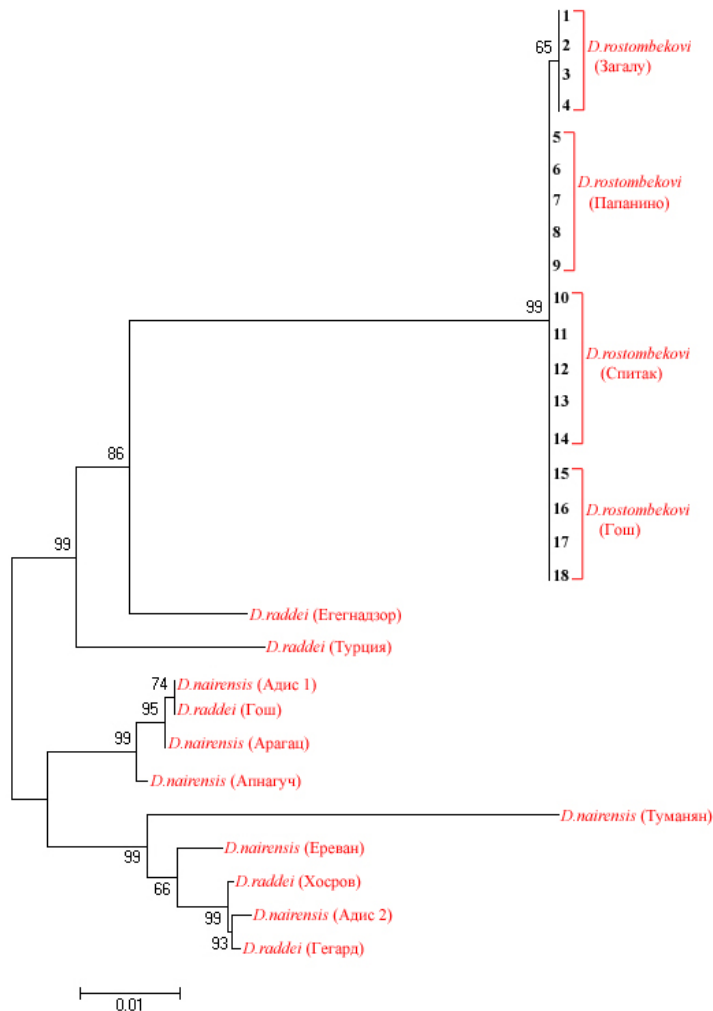


Рисунок 11. NJ-дендрограмма (Neighbor-Joining tree), построенная на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *cyt b* (1044 п.н.) митохондриальной ДНК однополых и двуполых видов ящериц рода *Darevskia* (1 – 18). Для каждого разветвления дана “bootstrap”-поддержка (1000 реплик). Соответствующие участки нуклеотидных последовательностей митохондриальной ДНК особей *D.raddei* и *D.nairensis* были взяты из работы Fu et al., 2000.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

I. Герминальные и соматические мутации, выявляемые ДНК-фингерпринтингом у партеногенетических ящериц *D.armeniaca*

Обнаруженные с помощью (CT)₉, (CTG)₅, (GATA)₄, (GACA)₄ (Рис. 1), (GGCA)₄ проб мутации у потомков *D.armeniaca*, скорее всего, являются результатом изменений в герминальных клетках, хотя нельзя исключать и вероятность соматической природы мутаций, как было показано в случае использования (CAC)₅ фингерпринтной пробы (Рис. 2, 3). Например, у родственного партеногенетического вида *D.unisexuialis* обнаруженные мутации, выявляемые с помощью (GATA)₅ зонда, могут быть как герминальными, так и соматическими и приводить к тканевому мозаицизму [Токарская и др., 2003; Tokarskaya et al., 2004]. Кроме того, использование (TCC)₅₀ и, особенно (TCT)₆, ДНК проб выявило

значительную внутрисемейную вариабельность в образцах ДНК *D.unisexuаlis*. Было показано, что повышенная вариабельность (TCC/TCT)_n содержащих локусов по крайней мере частично связана с существованием в геноме *D.unisexuаlis* фракции диспергированных (TCC/TCT)_n последовательностей. Предполагается, что мутации в некоторых нестабильных (TCC/TCT)_n микросателлитсодержащих локусах обуславливают их структурное разнообразие в популяциях *D.unisexuаlis* [Рысков и др., 2000].

В семьях *Darevskia armeniaca* во всех исследованных случаях с использованием (CT)₉, (CTG)₅, (GATA)₄, (GACA)₄, (GGCA)₄ и (CAC)₅ проб (Рис. 1, 2) мутантные фрагменты выявляются у потомков первого поколения и отличаются от материнских по электрофоретической подвижности. Возможно, что нестабильные фрагменты возникают в результате RFLP-мутаций [Wyman, White, 1980; Уайт и др., 1988], а также в результате хромосомных перестроек генетически нестабильных гибридных кариотипов, приводящих к RFLP-вариациям и наблюдаемому разнообразию фингерпринтных фенотипов [Куприянова, 1999]. Нуклеотидные замены могут приводить к полиморфизму сайтов рестрикции и следовательно, являться одной из причин рестрикционного полиморфизма как в соматических, так и в половых клетках, и, соответственно, наблюдаемому изменению фингерпринтных фенотипов у потомков по сравнению с материнскими. В большинстве случаев ДНК фингерпринты всех потомков из одной семьи были одинаковы и отличались от материнского. Разницу результатов, полученных при использовании различных микросателлитных маркеров, можно объяснить временем возникновения мутации в ходе онтогенеза и гаметогенеза.

Генетические изменения, возникающие во время последних стадий предмейотических делений во время гаметогенеза, могут проникать в популяционный генофонд в виде “кластера” (копии новой мутации). “Кластерные” мутации возникают за счет удвоения предмейотической мутации во время деления герминальных клеток, что способствует распространению мутаций среди огромного количества гамет одного организма [Woodruff, Tompson, 1992; Jones et al., 1999]. Этим можно объяснить, что обнаруженные у *D.armeniaca* мутантные (GACA)_n, (GGCA)_n и (GATA)_n фрагменты были одинаковы у всех потомков из одной семьи и встречались в популяционной выборке в виде полиморфных локусов с той же электрофоретической подвижностью. Однако, если такая же мутация произошла позже, например, на поздних стадиях мейоза или во время созревания гамет, изменения могут затронуть только одну половую клетку [Woodruff, Tompson, 1992; Jones et al., 1999], чем отчасти можно объяснить наличие мутантного фрагмента только у одного из потомков в некоторых семьях *D.armeniaca*. Прямыми последствиями кластерных мутаций является то, что идентичные варианты аллелей возникают один раз и распространяются в последующих

поколениях потомков, что в дальнейшем может привести к внутри- и межпопуляционной дифференциации [Woodruff et al., 1996].

“Кластерные” мутации могут составлять 20 – 50% от всех новых мутантных аллелей, проникающих в популяции [Woodruff, Tompson, 1992; Woodruff et al., 1996]. Такие мутации могут возникать в предковых аллелях и передаваться потомку как от матери, так и от отца [Jones et al., 1999]. Было показано, что во многих случаях мутации в основном происходили в результате изменений в микросателлитных повторах и заключались в изменении длины мотивов на одну и более единиц, частота мутаций во многих случаях зависела от длины микросателлитных аллелей [Jones et al., 1999; Brohede et al., 2002].

Очень важно время возникновения мутаций во время онтогенеза. Если мутация возникает перед дифференцировкой герминальных и соматических клеток, в ряде случаев помимо герминальных мутаций может возникать и соматический мозаицизм.

Интересно, что (CAC)₅ зонд выявлял нестабильные фрагменты у потомков *D.armeniaca* с высокой частотой, но проявлял низкий уровень популяционного полиморфизма (**Рис. 2**). Более того, анализ различных тканей и органов взрослых ящериц выявил тканевой мозаицизм по локусам, содержащим (CAC)_n мотивы (**Рис. 3**). Это может свидетельствовать о соматической природе обнаруженных мутаций. Если мозаицизм возникает во время эмбриогенеза, то соматический мозаицизм и мутации в герминальных клетках могут одновременно присутствовать у одного и того же организма – это зависит от специализации затронутых клеток и от стадии развития, на которой произошло событие, приводящие к мозаицизму. Мутации, которые возникают на более поздних стадиях развития, наиболее полно могут объяснить характерные признаки соматического мозаицизма. И наоборот, если мутация происходит до стадии бластулы, то мозаичный характер может быть потерян. Мутации, происходящие в соматических клетках на поздних стадиях развития, могут не проявляться во время постнатального периода и раннего развития до тех пор, пока на них не окажет воздействие изменение каких-либо других генетических факторов или факторов окружающей среды. На различных модельных организмах была показана важная роль селекционных механизмов в поддержании и распространении новых мутаций в соматических клетках. Селекция может работать на разных стадиях развития, особенно на ранних стадиях эмбриогенеза. [Youssofian, Pyeritz, 2002].

В настоящее время основной моделью возникновения и поддержания соматических мутаций являются репликационные, рекомбинационные [Harrison, Carpenter, 1977; Liang et al., 2000] и репарационные механизмы, а также хромосомная нестабильность. Кроме того, соматический мозаицизм может являться результатом различных клеточных механизмов, приводящих к аномальной хромосомной сегрегации [Youssofian, Pyeritz, 2002].

Молекулярные и хромосомные перестройки часто являются обычным явлением для многих организмов. Известно, что перестройки хромосом – пери- и парацентрические инверсии наряду с другими хромосомными аномалиями – часто встречающийся тип структурных нарушений в кариотипах диплоидных и триплоидных партеногенетических видов ящериц [Куприянова, 1999]. К соматическому мозаицизму могут приводить случайные мутации, различные эпигенетические изменения ДНК, а также любые генетические механизмы, вызывающие изменения генной экспрессии [Youssofian, Pyeritz, 2002].

Потенциальными причинами соматических и герминальных мутаций могут быть случайные факторы во время развития организма и изменения различных факторов окружающей среды [Youssofian, Pyeritz, 2002]. Известно, что однополые ящерицы могут обитать в менее приспособленных для обитания условиях, чем двуполые виды [Darevsky et al., 1985]. Как правило, это районы с повышенным радиоактивным фоном и довольно высокой сейсмической активностью, где на поверхность возможны небольшие выходы токсичных веществ (например, метана). Например, было отмечено, что в зонах с повышенной сейсмической активностью чаще возникают межвидовые гибриды [Асланян, 2004].

Полученные впервые в настоящей работе данные о высокой скорости герминальных и соматических мутаций у *D.armeniaca* подтверждают предположение о мутационной природе генотипического и клонального разнообразия фингерпринтных фенотипов, наблюдаемого в популяциях этого [Токарская и др., 2000] и других партеногенетических видов рода *Darevskia* [Tokarskaya et al., 2001].

II. Изучение природы аллельного полиморфизма локуса Du 215 (arm) у партеновида *D.armeniaca* и двуполых родительских видов *D.mixta* и *D.valentini*

Нестабильность микросателлитсодержащих локусов 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]. Помимо классических представлений о микросателлитных мутациях [Strand et al., 1993; Pearson et al., 1996; Gordenin et al., 1997] известны и другие механизмы, включающие высокую частоту инсерций и делеций, а также многочисленные точковые мутации во фланкирующих микросателлит областях ДНК [Ellegren, 2000]. Мутационные изменения в микросателлитных локусах можно представить как равновесие между точковыми мутациями и ошибками в процессе репликации ДНК [Bell, Jurka, 1997; Kruglyak et al., 1998].

Согласно классификации Вебера [Weber, Wong, 1993], описанные в данной работе аллели 1 и 2 локуса Du 215 (arm) являются сложными, так как в их составе одновременно

присутствуют GATA- и GACA-повторы. Аллель 3 является простым, так как содержит только один вид повторов в микросателлитном кластере (GATA-повторы). Следует отметить, что при рассмотрении прилежащих к микросателлиту областей обнаруживается наличие в них некоторых элементов, близких по структуре к GATA- и GACA-повторам. Непосредственно перед кластером имеется участок GAT, а после микросателлитного кластера – участок GCAA, который присутствует в аллелях 1 и 2, но отсутствует в аллеле 3 (Рис. 6 и 7). Скорее всего, это единый микросателлитный кластер, но вырожденный на концах. Сложная структура микросателлита свидетельствует о возможности возникновения “несовершенных” повторов в результате мутации – “сдвига рамки” на неполное мономерное звено. Наблюдаемые различия между аллелями 1 и 2 Du 215 (arg), выражающиеся в изменении размера кластера на одно мономерное звено GATA, соответствуют классической одноступенчатой модели (“Stepwise mutation model”, SMM) [Schlötterer, Tautz, 1992; Weber, Wong, 1993]. Однако изменения в структуре аллеля 3 соответствуют модифицированному варианту этой модели [Di Rienzo, 1994], согласно которой некоторые микросателлиты способны к изменению длины повтора более чем на одно мономерное звено. Анализ мутаций индивидуальных микросателлитных локусов в различных организмах показал, что изменения происходящие в них от 5% до 75% случаев носят характер мультиступенчатых мутаций [Ellegren, 2004; Shimoda et al., 1999]. Кроме этого, имеются данные, свидетельствующие о полярности мутаций внутри микросателлитных ДНК [Brohede, Ellegren, 1999] и повышенной частоте однонуклеотидных замен во фланкирующих микросателлит областях ДНК [Ellegren, 1997]. При этом частота мутаций в них может превышать частоту мутаций микросателлитного кластера, что показано на примере динуклеотидных микросателлитов беспозвоночных [Orti et al., 1997; Colson, Goldstein, 1999]. В некоторых случаях отличия аллельных вариантов ограничивались только прилежащими участками ДНК [Colson, Goldstein, 1999].

У *D.armeniaca* и родительских двуполовых видов (*D.mixta* и *D.valentini*) установлено наличие точковых замен в прилежащих к микросателлиту областях в аллельных вариантах локуса Du215 (arg) (Рис. 6 и 7). Возможно, что подобные нуклеотидные замены встречаются с определенной периодичностью в геноме разных видов ящериц рода *Darevskia*. Например, наличие точковых замен во фланкирующих областях было показано для двух локусов Du215 и Du281 у *D.unisexualis* [Корчагин, 2004; Корчагин, 2004 (a)]. Они могут соответствовать горячим точкам мутаций, которые возникают вблизи повторяющихся элементов генома [Brookfield, 2003]. Ранее установлена взаимосвязь некоторых подсемейств Alu-повторов приматов с различными типами три- и тетрануклеотидных микросателлитных ДНК [Arcot et al., 1995].

Таким образом, в случае партеногенетических ящериц, имеющих гибридное происхождение, полученные данные о структуре аллелей и полиморфизму микросателлитных локусов могут быть использованы для изучения филогенетических связей однополых и двуполых видов рептилий.

III. Изменчивость фингерпринтных маркеров ДНК в популяциях однополых (*L.guentherpetersi*) и двуполых (*L.reevesii*) ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis*

Нами показано, что ДНК-фингерпринтные профили особей партеногенетического вида *L.guentherpetersi*, получаемые при использовании в качестве гибридизационных проб (GACA)₄, (CAC)₅ и (GGCA)₄, в отличие от профилей двуполого вида *L.reevesii*, характеризуются видоспецифичными спектрами (**Рис. 4а, б**), что можно считать одним из подтверждений партеногенетической природы данного вида.

Однополый триплоидный вид *L.guentherpetersi* ($P > 0.05$) по степени внутривидового сходства сопоставим с однополыми видами рода *Darevskia* (*D.dahli*, *D.armeniaca*, *D.unisexuality*) [Кан и др., 1998; Tokarskaya et al., 2001; Мартиросян и др., 2003]. С другой стороны, сравнительные оценки изменчивости ядерных маркеров ДНК у клональных видов рыб *Rivulus marmoratus* и *Carassius longsdoffii* [Turner et al., 1990; Turner et al., 1992; Umino et al., 1997] показали значительно большую изменчивость фингерпринтных маркеров у рыб, чем у партеногенетических ящериц рода *Leiolepis* ($P < 0.01$) и рода *Darevskia*.

Однако партеногенетические ящерицы *L.guentherpetersi* высокополиморфны по локусам, детектируемым (GATA)₄ пробой, причем каждая отдельная особь партеновида обладает четким индивидуум-специфичным ДНК-фингерпринтным профилем, как и особи двуполого родительского вида *L.reevesii* (**Рис. 4в**). Ранее, при изучении генетической изменчивости популяций партеногенетических скальных ящериц Кавказа *Darevskia unisexuality* (сем. Lacertidae), впервые была показана гипервариабельность локусов, содержащих (TCC/TCT)_n полипиримидиновые мотивы [Рысков и др., 2000; Кан и др., 2000]. Анализ данных, полученных при использовании (TCC)₅₀ и (TCT)₆ ДНК зондов, по каждой популяции *D.unisexuality* показал, что особи этого вида не образуют ДНК-фингерпринтных групп, а характеризуются индивидуум-специфическими ДНК-фингерпринтными спектрами. В дальнейшем анализе семей *D.unisexuality* была выявлена супернестабильность этих микросателлитсодержащих локусов, что указывает на неслучайный характер происходящих изменений [Рысков и др., 2000; Кан и др., 2000; Рысков и др., 2003]. Интересно, что обнаруженный у партеновида *L.guentherpetersi* внутривидовой полиморфизм (GATA)_n содержащих локусов оказался сопоставим с таковым у *D.unisexuality* по (TCC/TCT)_n содержащим локусам ($P > 0.05$).

Кариологические исследования партеновида *L.guntherpetersi* показали, что этот вид является триплоидным и структурные характеристики его кариотипа близки к данным, полученным при анализе кариотипов родственных двуполых диплоидных видов: *L.reevesii*, *L.guttata* (предположительно участвовали в возникновении *L.guntherpetersi*) и *L.belliana* [Darevsky, Kupriyanova, 1993]. Такие кариотипы считаются нестабильными, так как в них с большей вероятностью, чем в обычных геномах, могут происходить различные хромосомные перестройки, которые могут являться одной из причин возникновения мутаций и структурных перестроек [Куприянова, 1999], приводящих к RFLP-полиморфизму и выявленному разнообразию фингерпринтных фенотипов.

Таким образом, в настоящей работе впервые обнаружены высокополиморфные $(GATA)_n$ содержащие локусы у ящериц рода *Leiolepis*. Хотя природа выявленного полиморфизма остается неясной, можно предположить, что обнаруженные локусы обладают повышенной нестабильностью и могут быть обнаружены у партеногенетических потомков, как в случае *D.unisexualis*. Природа нестабильных микросателлитсодержащих локусов может быть определена путем клонирования и секвенирования соответствующих фрагментов ДНК.

IV. Генетическая дифференциация партеновида *D.rostombekovi* по данным анализа RAPD-маркеров и митохондриального гена *cyt b*

RAPD-анализ достаточно эффективно подходит для определения внутривидовой изменчивости как у двуполых, так и у однополых видов. Однако изменчивость RAPD-маркеров в популяциях партеногенетических кавказских скальных ящериц невелика (Таблицы 4 и 5) и сопоставима с данными, полученными Рябиной и соавторами [Ryabinina et al., 1999], и значительно ниже, чем у некоторых видов гиногенетических рыб. Несмотря на это, результаты, полученные с помощью RAPD-анализа, согласуются с данными о межпопуляционной изменчивости фингерпринтных маркеров у *D.rostombekovi* [Мартиросян и др., 2002] и свидетельствуют о значительной дивергенции Севанской популяции.

Согласно современным представлениям, все партеногенетические виды рода *Darevskia* появились на Кавказе в постледниковую эпоху и являются молодыми видами, теоретически имеющими равные шансы для возникновения новых клонов [Darevsky, 1993]. Возможными источниками клональной изменчивости в популяциях этих видов могут быть происхождение клонов от разных особей основателей и мутации, возникающие в процессе эволюции клонов [Parker, 1979; Cole, Townsend, 1975; Moritz et al., 1989]. Так, например, с хромосомными мутациями связывают образование новых клонов и/или географически изолированных хромосомных рас. Такие клоны, например, были обнаружены у

партеногенетических видов гекконов рода *Hemidactylus* [Даревский, 1993]. В свете имеющихся данных не исключено, что особи из изолированной популяции побережья озера Севан представляют собой такую географическую хромосомную расу и/или клон, возникший в результате ряда хромосомных мутаций, произошедших в ходе кариологической эволюции вида.

Результаты анализа дендрограммы, построенной по данным сравнения нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *cyt b*, показали, что популяция Загалу образует единую группу с другими популяциями *D.rostombekovi*, которая наиболее близко кластеризуется с популяцией материнского вида *D.raddei* из Егегнадзора (**Рис. 11**). Полученные данные свидетельствуют о монофилии вида *D.rostombekovi*. Хотя генетические дистанции между исследованными популяциями *D.rostombekovi* невелики (0.001), полученные данные указывают на существование второго митотипа у *D.rostombekovi*, обнаруженного в популяции Загалу и отличающегося всего одной нуклеотидной заменой от других популяций этого вида. Сравнительно малое число молекулярных характеристик, отличающих морфологически сходные виды, может говорить о недавней дивергенции таксонов, как в случае ящериц видов *L.viridis* и *L.bilineata*, а также *L.trilineata* и *L.media* [Калябина-Хауф, Ананьева, 2004]. Данные виды признаются самостоятельными с позиций концепции вида, но с оговоркой, что в настоящее время они находятся на стадии дивергенции [Amann et al., 2001; Joger et al., 2001]. У партеногенетических гекконов *Heteronotia binoei* было обнаружено 15 гаплотипов с довольно низким уровнем различий между нуклеотидными последовательностями, что может свидетельствовать о недавнем происхождении партеногенетических форм и о таком событии, как прохождение вида через “бутылочное горлышко”. Установлено, что часть гаплотипов, выявленных у однополых форм, была унаследована от двуполых родительских форм, а остальные гаплотипы, по-видимому, возникли в результате последующих мутаций в митохондриальной ДНК [Moritz, 1991].

Митохондриальная ДНК эволюционирует гораздо быстрее, чем ядерная. Средняя скорость нуклеотидных замен в митохондриальной ДНК обычно превышает таковую для ядерной ДНК в 5 – 20 раз и оценивается в 2 – 4% за миллион лет [Brown et al., 1979; Wilson et al., 1985]. Скорость накопления замен нуклеотидов, приводящих к аминокислотным заменам в митохондриальной ДНК и ядерной ДНК сопоставимы, но “молчащие” замены появляются в митохондриальном геноме в 100 раз чаще. В результате возникает широкий внутривидовой полиморфизм, и иногда ощутимые изменения выявляются даже в пределах нескольких поколений. Единичные замены обуславливают различия в последовательностях митохондриальной ДНК и доминируют над делециями и вставками в

эволюции митохондриального генома, что было показано в большинстве исследований по сравнительному анализу митохондриальной ДНК животных [Brown, 1983]. При случайном характере замещений среди мутаций обычно преобладают транзиции, а наиболее редки проявляющиеся трансверсии. Показано, что редкие типы трансверсий обнаруживаются лишь у эволюционно старых видов, причем соотношение транзиций и трансверсий изменяется в пользу последних с увеличением времени дивергенции сравниваемых таксонов [Brown, 1983].

Полученные в этой работе данные согласуются с результатами, полученными при изучении близкородственных таксонов, время дивергенции которых меньше 25 млн. лет. [Калябина-Хауф, Ананьева, 2004], и свидетельствуют о том, что вид *D.rostombekovi* является сравнительно молодым видом и находится на стадии внутривидовой дифференциации. Таким образом, данные анализа ядерных и митохондриальных маркеров ДНК позволяют по-иному взглянуть на популяционную структуру и эволюционную историю этого вида.

ВЫВОДЫ

1. Впервые с помощью ДНК-фингерпринтинга получены данные о значительном вкладе герминальных и соматических мутаций в генотипическое и клональное разнообразие однополых популяций *D.armeniaca*.
2. Установлено, что локус Du 215 (arm) является полиморфным и в популяциях *D.armeniaca* представлен как минимум тремя аллельными вариантами, которые наследуются от двуполых родительских видов и отличаются между собой размером и составом микросателлитного кластера, а также одиночными нуклеотидными заменами в прилежащих участках ДНК. Показано, что микросателлитный кластер локуса Du 215 (arm) имеет сложное строение и помимо GATA-повторов содержит GACA-повторы, которые отсутствовали в локусе Du 215 у *D.unisexuialis*.
3. Впервые с помощью ДНК-фингерпринтного анализа обнаружен высокий уровень полиморфизма локусов, содержащих (GATA)_n, у однополых (*L.guentherpetersi*) и двуполых (*L.reevesii*) ящериц рода *Leiolepis*.
4. Впервые с помощью RAPD-анализа показана внутривидовая дифференциация у *D.rostombekovi*, что находится в соответствии с данными об изменчивости ДНК-фингерпринтных маркеров у этого вида.
5. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *cyt b* *D.rostombekovi* из трех популяций Северной Армении и реликтовой популяции побережья озера Севан показал, что все проанализированные особи имеют общее происхождение (материнский

вид *D.raddei* из популяции Егегнадзор). Кроме того, у особей из популяции побережья озера Севан была обнаружена одна нуклеотидная замена – транзиция С→Т типа в первой кодон-позиции, которая отсутствовала у особей из других исследованных популяций.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мартиросян И.А., Кан Н.Г., Петросян В.Г., Малышева Д.Н., Трофимова А.А., Даниелян Ф.Д., Даревский И.С., Корочкин Л.И., Рысков А.П., Токарская О.Н. Фингерпринтный анализ вариабельности мини- и микросателлитных повторов ДНК у партеногенетических ящериц *Darevskia armeniaca*. // Генетика. 2003. Т. 39(2). С. 215-222.
2. Петросян В.Г., Токарская О.Н., Малышева Д.Н., Рысков А.П. Количественная оценка генного разнообразия и межпопуляционной дифференциации партеногенетических видов ящериц рода *Darevskia* на основе мини- и микросателлитных маркеров ДНК. // Генетика. 2003. Т. 39(10). С. 1418-1426.
3. 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. V. 270. P. 509-513.
4. Малышева Д.Н., Токарская О.Н., Даниелян Ф.Д., чл-корр. Даревский И.С., чл-корр. Рысков А.П. Обнаружение микросателлитных мутаций у партеногенетических ящериц *Darevskia armeniaca*. // Доклады Академии Наук. 2005. Т. 400(2). С. 265-268.
5. Малышева Д.Н., Даревский И.С., Токарская О.Н., Петросян В.Г., Мартиросян И.А., Рысков А.П. Изучение генетической изменчивости у однополого и двуполого видов ящериц Юго-Восточной Азии рода *Leiolepis*. // Генетика. 2006. Т. 42(5). С. 581-586.
6. Мартиросян И.А., Малышева Д.Н., Бадаева Т.Н., Токарская О.Н. Изучение изменчивости мини- и микросателлитных маркеров ДНК в популяциях партеногенетической ящерицы *Darevskia rostombekovi*. Тезисы научных докладов. III съезд биохимического общества. Санкт-Петербург, 26.06.2002-01.07.2002, С.302.
7. Корчагин В.И., Чуриков Н.А., Омельченко А.В., Малышева Д.Н., Севастьянова Г.А., Токарская О.Н. Клонирование микросателлитных последовательностей ДНК партеногенетических ящериц *Darevskia unisexualis*. XV Зимняя международная молодёжная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. Москва, 10-14 февраля 2003 г., Тезисы докладов и стендовых сообщений. С. 39.
8. Martirosyan I.A., Badaeva T.N., Malysheva D.N., Korchagin V.I., Tokarskaya O.N. Highly instable (GATA)_n-containing sequences in parthenogenetic lizards *Darevskia unisexualis*

- (*Lacertidae*). International conference “Molecular genetics of eucaryotes”. Russian Academy of Sciences. Institute of Gene Biology. Moscow, 4-7 February 2003, Abstracts. P. 26.
9. Malysheva D.N., Martirosyan I.A., Petrosyan V.G., Tokarskaya O.N. Clonal diversity in parthenogenetic rock lizards *Darevskia rostombekovi* analyzed by DNA fingerprinting. 12th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica. Saint-Petersburg, Russia, 12-16 August 2003, Programme and Abstracts. P. 102.
 10. 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*. Conference “Advanced in molecular cell biology” devoted to the 10th anniversary of the center for Medical Studies. University of Oslo for Medical Studies (1993-2003), Institute of Gene Biology RAS, Moscow, June 17-18 2004, Abstracts. P. 73-82.
 11. Малышева Д.Н. Обнаружение микросателлитных мутаций у партеногенетических ящериц *Darevskia armeniaca* (*Lacertidae*). 9-я Международная Пушинская Школа-Конференция Молодых Ученых “Биология – наука XXI века”. Институт Физико-Химических и Биологических Проблем Почвоведения РАН, Пушкино, 18-22 апреля 2005 г., Сборник тезисов. С. 40.
 12. Malysheva D.N., Tokarskaya O.N., Danielyan F.D., Darevsky I.S., Ryskov A.P. Instability of microsatellite loci in parthenogenetic lizard *Darevskia armeniaca* (*Lacertidae*). Proc. International conference “Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution”. Yerevan (Armenia), 8-11 September 2005, P. 75.
 13. Malysheva D.N. Instability of microsatellite loci in parthenogenetic lizard *Darevskia armeniaca* (*Lacertidae*). Proc. 9th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (France), 21-23 September 2005, P. 62.
 14. Вергун А.А., Токарская О.Н., Малышева Д.Н., Севастьянова Г.А. Молекулярно – генетическая характеристика микросателлитных последовательностей в геноме партеногенетического вида ящериц *Darevskia armeniaca* (сем. *Lacertidae*). XVIII Зимняя международная молодежная научная школа “Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии”. Москва, 07 – 10 февраля 2006 г. Тезисы докладов и стендовых сообщений. С. 58.
 15. Малышева Д.Н., Вергун А.А., Мартиросян И.А. Внутривидовая дифференциация партеногенетической ящерицы *Darevskia rostombekovi* (сем. *Lacertidae*) по данным анализа ядерного и митохондриального генома. Материалы Международной конференции “Генетика в России и Мире”, посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 28 июня – 2 июля 2006 г., С. 117.