

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИБРИДНЫХ ОСОБЕЙ СКАЛЬНЫХ ЯЩЕРИЦ *Darevskia armeniaca* × *Darevskia valentini* НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ

© 2023 г. А. Е. Гирнык¹, *, А. А. Вергун^{1, 2}, А. П. Рысков¹

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

²Московский педагогический государственный университет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aegirnyk@mail.ru

Поступила в редакцию 06.10.2022 г.

После доработки 16.11.2022 г.

Принята к публикации 22.11.2022 г.

В работе представлены результаты микросателлитного генотипирования гибридных ящериц *D. armeniaca* × *D. valentini* из симпатрических популяций Армении. По совокупности локусов *Du281* и *Du47G* идентифицированы триплоидные особи и определено их происхождение. Показано, что гибриды содержат как аллели материнского партеновида — *D. armeniaca*, так и аллели отцовского вида — *D. valentini*.

Ключевые слова: *Darevskia*, триплоиды, симпатрия, микросателлиты, генотипирование.

DOI: 10.31857/S0016675823060073, **EDN:** SSLMKR

Гибридогенное видообразование лежит в основе теории ретикулярной (сетчатой) эволюции [1]. В ряде случаев этот феномен приводит к образованию однополых, клонально размножающихся с помощью партеногенеза, видов. Среди позвоночных облигатный партеногенез был впервые обнаружен у кавказских скальных ящериц рода *Darevskia*, который сегодня включает 29 двуполых и семь однополых (партеногенетических) диплоидных видов гибридного происхождения [2]. Отличительными особенностями рода *Darevskia* являются как происхождение и большое разнообразие партеновидов, так и продолжающиеся процессы межвидовой гибридизации однополых самок с самцами двуполых видов в зоне частичного перекрытия их ареалов. При этом образующиеся в результате полиплоидные гибридные особи рассматриваются как возможные участники промежуточных этапов сетчатой эволюции в этой группе рептилий [3, 4]. Полиплоидные гибриды также известны и среди многих других родов ящериц: *Aspidoscelis* [5, 6], *Liolaemus* [7], *Hemidactylus* [8]. Гибриды рода *Darevskia* изучаются более 50 лет [9, 10], однако до сих пор накоплено не так много генетических данных, которые бы позволяли оценить вклад таких ящериц в эволюционную историю рода. Молекулярно-генетические исследования близкородственных однополых и двуполых видов, а также их гибридов, могут помочь в изучении различных путей эволюции у рептилий, механизмов формиро-

вания генетического разнообразия и процессов адаптации.

Среди кавказских скальных ящериц гибридные особи были зарегистрированы во многих районах Армении, а также в Нагорном Карабахе и Грузии в зонах симпатричного обитания разных однополых и двуполых видов [11, 12]. Частичное перекрытие ареалов партеногенетического вида *D. armeniaca* и двуполого вида *D. valentini* и появление в них гибридов отмечено в зонах Лчашен, Кучак, Теж, Сотк [3, 11–15], однако известны и другие симпатрические ареалы этих видов в районах: Ахалкалаки, Артаваза, Мец Сепасара и оз. Ханчали [11, 15]. Одной из уникальных смешанных популяций в Армении является популяция Кучак, поскольку в ней образуются полиплоидные гибриды сразу двух партеногенетических видов ящериц *D. armeniaca* и *D. unisexualis*, а в качестве отцовского вида выступает двуполый вид *D. valentini*. По данным исследований 2001–2008 гг. в популяции Кучак процент гибридных особей был особенно высок (свыше 35%) по сравнению с другими симпатрическими популяциями (7–12%) [3, 16]. При этом гибриды *D. armeniaca* × *D. valentini* составляли лишь небольшую часть [3, 13]. Образующиеся в симпатрических зонах триплоидные гибриды разного происхождения объединяют в себе морфологические характеристики обоих родительских видов, поэтому существуют трудности в дифференциации триплоидных ги-

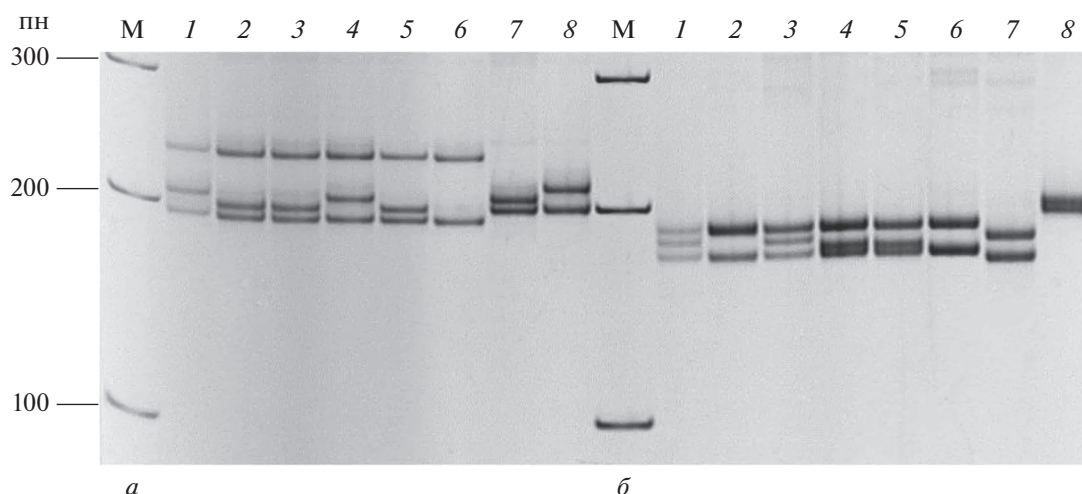


Рис. 1. Картина электрофоретического фракционирования продуктов ПЦР-амплификации микросателлитных локусов: *a* – *Du281*, *б* – *Du47G* в 8%-ном ПААГ. М – маркер молекулярного веса 100 бп (пн); 1–5 – триплоидные особи *D. armeniaca* × *D. valentini*; 6 – контрольная особь партеновида *D. armeniaca*; 7, 8 – контрольные особи родительского (отцовского) вида *D. valentini*.

бридов и их родителей, что требует использования более эффективных методов анализа [3].

В этой связи, в настоящей работе решалась задача по идентификации и дифференциации предполагаемых триплоидных гибридов из двух смешанных популяций, а также по определению происхождения этих полиплоидов. Ранее мы разработали методику молекулярно-генетической идентификации триплоидных гибридов *D. unisexualis* × *D. valentini*, используя для генотипирования микросателлитный локус *Du215* [17]. Однако для идентификации триплоидов *D. armeniaca* × *D. valentini* этот локус оказался мало пригоден. В данном исследовании для идентификации этих гибридов был использован вариант микросателлитного генотипирования на основе сочетания двух локусов ядерного генома (*Du281* и *Du47G*), которые были эффективны в популяционных исследованиях *D. armeniaca* [18].

Биологические образцы для анализа ДНК предположительных триплоидов *D. armeniaca* × *D. valentini* (четыре особи), *D. unisexualis* × *D. valentini* (одна особь) были собраны и определены герпетологом И.С. Даревским в период с 1999 по 2000 гг. в популяциях Теж (Памбакский хребет; 40°42′8.08″ N 44°36′30.80″ E) и Кучак (восток Арагацотнской области; 40°31′49.81″ N 44°17′3.43″ E) Армении. ДНК выделяли из фрагмента хвоста ящериц стандартным фенол-хлороформным методом [19]. Генотипирование проводили по двум микросателлитным локусам ядерного генома (*Du281* и *Du47G*), используя ПЦР-амплификацию с последующим разделением аллелей в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и их полноразмерным секвенированием, как это описано ранее [18, 20].

В настоящей работе были также апробированы микросателлитные локусы *Du215* и *Du323*, однако локусы *Du281* и *Du47G* оказались наиболее эффективными в связи с лучшим разделением аллелей.

По результатам монолокусной ПЦР все особи были гетерозиготными по исследованным локусам и имели по три аллеля, за исключением одной особи, которая имела только два аллеля по локусу *Du47G*. На рис. 1 показано, как разделяются видоспецифичные аллели локусов *Du281* и *Du47G* у этих особей (дорожки 1–5), у контрольной особи партеновида *D. armeniaca* (дорожка 6) и двуполого вида *D. valentini* (дорожки 7–8).

Для проведения видовой идентификации выявленных аллелей локусов *Du281* и *Du47G* было проведено их полноразмерное секвенирование, на основе которого определены аллель-специфические маркеры (микросателлиты и SNPs в прилежащих к микросателлиту областях аллеля). Эти аллель-специфические полиморфные маркеры локусов сравнивались с таковыми, ранее полученными для *D. valentini* и партеновидов *D. armeniaca* и *D. unisexualis* из разных популяций Армении [21, 22]. Сочетание этих маркеров отражает гибридное происхождение триплоидов и позволяет определить видовую принадлежность аллелей. Структурные различия выявленных аллелей исследуемых особей представлены в табл. 1.

Все исследованные гибридные особи по локусу *Du281* (рис. 1, *a*) несли по два аллеля материнского вида *D. armeniaca*: *Du281(arm)2* и *Du281(arm)4* и отличались только по отцовскому аллелю *D. valentini* – у особей 1 и 4 выявлен аллель *Du281(val)2*, а у особей 2, 3, 5 выявлен аллель *Du281(val)3* (табл. 1). Аллель *Du281(arm)4*, общий у триплоидных осо-

Таблица 1. Структурные различия аллельных вариантов локусов *Du281* и *Du47G* исследованных особей

Аллельные варианты локусов		Размер (пн)	Структурные различия микросателлитного кластера	SNP*
<i>Du281</i>	<i>Du281(arm)2</i>	225	5'(GGTA)(GATA) ₉ GAT(GATA)(GGTA) ₂ (GAT)(GATA) ₄ 3'	T (+15)
	<i>Du281(arm)4</i>	183	5'(GATA) ₈ 3'	C (+15)
	<i>Du281(val)2</i>	195	5'(GATA) ₁₁ 3'	C (+15)
	<i>Du281(val)3</i>	191	5'(GATA) ₁₀ 3'	C (+15)
	<i>Du281(val)5</i>	183	5'(GATA) ₈ 3'	C (+15)
<i>Du47G</i>	<i>Du47G(arm)2</i>	184	5'(GATA) ₉ (GACA) ₄ (GATA) ₂ GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), A (+21), G (+52), T (+56)
	<i>Du47G(arm)3</i>	176	5'(GATA) ₁₁ (GACA)(GATA)GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), T (+21), C (+52), A (+56)
	<i>Du47G(arm)4</i>	172	5'(GATA) ₁₀ (GACA)(GATA)GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), T (+21), C (+52), A (+56)
	<i>Du47G(arm)5</i>	168	5'(GATA) ₉ (GACA)(GATA)GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), T (+21), C (+52), A (+56)
	<i>Du47G(val)8</i>	176	5'(GATA) ₁₁ (GACA)(GATA)GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), T (+21), C (+52), A (+56)
	<i>Du47G(val)9</i>	168	5'(GATA) ₉ (GACA)(GATA)GAT(GATA) ₂ 3'	T (+7), T (+21), C (+52), A (+56)

Примечание. * – в скобках даны расстояния в парах оснований: (+) – после микросателлитного кластера. Нумерация аллелей локусов *Du281* и *Du47G* для *D. armeniaca* и *D. valentini* дана как в статье [21] и как они депонированы в GenBank.

бей, совпадал с аллелем *Du281(val)5*, ранее выявленным в популяциях двуполого вида *D. valentini*, что говорит о гибридном происхождении как триплоидных особей, так и самого партеновида *D. armeniaca*, возникшего путем межвидовой гибридизации двуполого вида *D. mixta*, выступающего в качестве материнского и двуполого вида *D. valentini*, выступающего в качестве отцовского [21].

По локусу *Du47G* (рис. 1,б) две особи (1 и 3) несли аллели *D. armeniaca Du47G(arm)2*, *Du47G(arm)3*, *Du47G(arm)5*. Аллели *Du47G(arm)3* и *Du47G(arm)5* совпадали с аллелями *D. valentini Du47G(val)8* и *Du47G(val)9*. Две другие особи (4 и 5) также несли аллели *Du47G(arm)2* и *Du47G(arm)5*, но отличались наличием аллеля *Du47G(arm)4*. Особь 2, по результатам ПЦР-анализа по локусу *Du47G* имела только два аллеля, также общие для гибридов *Du47G(arm)2* и *Du47G(arm)5*. Эти данные могут говорить о том, что у этой особи два аллеля, наследуемые от партеновида *D. armeniaca* и двуполого вида *D. valentini* идентичны, а третий аллель, наследуемый также от *D. armeniaca*, отличался как по подвижности в ПААГ, так и по нуклеотидной последовательности. Такой факт был выявлен ранее для локуса *Du215*, который был использован для идентификации триплоидных гибридов *D. uni-*

sexualis × *D. valentini* [17], но оказался недостаточно эффективным в отношении гибридов *D. armeniaca* × *D. valentini* из-за идентичности “отцовских” аллелей *D. valentini*. Один из образцов (3) фенотипически был определен как гибрид *D. unisexualis* × *D. valentini*. Однако по картине электрофоретического фракционирования аллелей используемых локусов и по результатам их секвенирования этот образец мы отнесли к гибриду *D. armeniaca* × *D. valentini*. О возможных ошибочных идентификациях предполагаемых гибридов ранее уже сообщалось в литературе [13].

Таким образом, приведенный нами вариант микросателлитного генотипирования по совокупности локусов *Du281* и *Du47G* позволил идентифицировать триплоидных особей, а секвенирование выявленных аллельных вариантов – определить происхождение гибридов *D. armeniaca* × *D. valentini*. Дополнительное использование для генотипирования локуса *Du215* позволяет достоверно различить триплоидов разного происхождения.

Авторы благодарны И.С. Даревскому за предоставление биологических образцов. А также И.А. Мартиросян за ценные советы при подготовке рукописи.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-14-00083.

Работу с животными проводили с соблюдением стандартов, разработанных Министерством защиты природы Армении (код разрешения 5/22.1/51043). Исследование одобрено этическим комитетом МГУ (номер разрешения 24-01) и проведено в строгом соответствии с этическими принципами и научными стандартами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobzhansky Th. Genetic nature of species differences // Am. Natur. 1937. V. 71. № 735. P. 404–420. <https://doi.org/10.1086/280726>
2. Uetz P., Freed P., Aguilar R., Hošek J. The Reptile Database (Online resource) // URL: <http://www.reptile-database.org> (accessed 10.10.2022)
3. Danielyan F., Arakelyan M., Stepanyan I. The progress of microevolution in hybrids of rock lizards of genus *Darevskia* // Biol. Z. Armen. 2008. V. 60. № 1–2. P. 147–156.
4. Spangenberg V., Arakelyan M., Galoyan E. et al. Reticulate evolution of the rock lizards: Meiotic chromosome dynamics and spermatogenesis in diploid and triploid males of the genus *Darevskia* // Genes. 2017. V. 8. № 6. P. 149. <https://doi.org/10.3390/genes8060149>
5. Moritz C.C., Wright J.W., Brown W.M. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (genus *Cnemidophorus*). III. *C. velox* and *C. exsanguis* // Evolution. 1989. V. 43. № 5. P. 958–968. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02542.x>
6. Taylor H.L., Walker J.M., Cole C.J., Dessauer H.C. Morphological divergence and genetic variation in the triploid parthenogenetic teiid lizard, *Aspidoscelis neotesselata* // J. Herp. 2015. V. 49. № 3. P. 491–501. <https://doi.org/10.1670/14-057>
7. Araya-Donoso R., Véliz D., Vidal M., Lamborot M. Relationships of the morphological variation in diploids, triploids and mosaics of *Liolaemus chiliensis* (Sauria: Liolaemidae) // Amphib. Reptil. 2017. V. 38. № 4. P. 503–515. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003132>
8. Kluge A.G., Eckardt M.J. *Hemidactylus garnotii* Dumeril and Bibron, a triploid all-female species of gekkonid lizard // Copeia. 1969. № 4. P. 651–664. <https://doi.org/10.2307/1441789>
9. Даревский И.С., Куликова В.Н. Систематические признаки и некоторые особенности оогенеза гибридов между обоеполой и партеногенетическими формами скальной ящерицы // Цитология. 1962. Т. 4. № 2. С. 160–170.
10. Darevsky I.S., Danielyan F.D. Diploid and triploid progeny arising from natural mating of parthenogenetic *Lacerta armeniaca* and *L. unisexualis* with bisexual *L. saxicola valentini* // J. Herp. 1968. V. 2. № 3–4. P. 65–69. <https://doi.org/10.2307/1563104>
11. Petrosyan V.G., Osipov F.A., Bobrov V.V. et al. New records and geographic distribution of the sympatric zones of unisexual and bisexual rock lizards of the genus *Darevskia* in Armenia and adjacent territories // Biodivers. Data J. 2020. V. 8. P. 1–30. <https://doi.org/10.3897/BDJ.8.e56030>
12. Arakelyan M.S., Danielyan F.D., Corti C. et al. Herpetofauna of Armenia and Nagorno-Karabakh. Salt Lake City: Society for Study of Amphibians and Reptiles, 2011. 149 p.
13. Freitas S.N., Harris D.J., Sillero N. et al. The role of hybridisation in the origin and evolutionary persistence of vertebrate parthenogens: a case study of *Darevskia* lizards // Heredity. 2019. V. 123. № 6. P. 795–808. <https://doi.org/10.1038/s41437-019-0256-5>
14. Carretero M., García-Muñoz E., Argaña E. et al. Parthenogenetic *Darevskia* lizards mate frequently if they have the chance: A quantitative analysis of copulation marks in a sympatric zone // J. Nat. Hist. 2018. V. 52. № 7–8. P. 405–413. <https://doi.org/10.1080/00222933.2018.1435832>
15. Galoyan E., Bolshakova A., Abrahamyan M. et al. Natural history of Valentin's rock lizard (*Darevskia valentini*) in Armenia // Zool. Res. 2019. V. 40. № 4. P. 277–292. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.036>
16. Даревский И.С., Даниелян Ф.Д. Естественная аллотриплоидия у некоторых видов скальных ящериц Кавказа и вероятное эволюционное значение этого феномена // Эволюция, экология, видообразование. Материалы конференции памяти Н.Н. Воронцова (1934–2000). М.: УНЦ ДО, 2001. С. 131–133.
17. Гирнык А.Е., Вергун А.А., Аракелян М.С., Рысков А.П. Молекулярно-генетическая идентификация триплоидных гибридов *Darevskia unisexualis* × *D. valentini* из симпатрических популяций Армении // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39. № 3. С. 46–48. <https://doi.org/10.17116/molgen20213903146>
18. Гирнык А.Е., Вергун А.А., Омельченко А.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика аллельных вариантов микросателлитных локусов *Du215*, *Du281*, *Du323* и *Du47G* у партеногенетических ящериц *Darevskia armeniaca* (сем. Lacertidae) // Генетика. 2017. Т. 53. № 4. С. 468–479.
19. Mathew C.G.P. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology. United States: Humana Press, 1984. V. 2. P. 31–34. <https://doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31>
20. 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. № 1–2. P. 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.11.020>
21. Girnyk A.E., Vergun A.A., Semyenova S.K. et al. Multiple interspecific hybridization and microsatellite mutations provide clonal diversity in the parthenogenetic rock lizard *Darevskia armeniaca* // BMC Genomics. 2018. V. 19. № 1. P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5359-5>
22. Vergun A.A., Girnyk A.E., Korchagin V.I. et al. Origin, clonal diversity, and evolution of the parthenogenetic lizard *Darevskia unisexualis* // BMC Genomics. 2020. V. 21. № 351. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6759-x>

Identification of Hybrid Specimens of Rock Lizards
***Darevskia armeniaca* × *Darevskia valentini* Based on Microsatellite Genotyping**

A. E. Girnyk^{a, *}, A. A. Vergun^{a, b}, and A. P. Ryskov^a

^a*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

^b*Moscow Pedagogical State University, Moscow, 119991 Russia*

^{*}*e-mail: aegirnyk@mail.ru*

The paper presents the results of microsatellite genotyping of hybrid lizards *D. armeniaca* × *D. valentini* from sympatric populations of Armenia. Triploid individuals were identified based on the totality of the *Du281* and *Du47G* loci and their origin was determined. It was shown that the hybrids contain both alleles of the maternal parthenospecies *D. armeniaca* and alleles of the paternal species *D. valentini*.

Keywords: *Darevskia*, triploids, sympatry, microsatellites, genotyping.