

УДК 575+598.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И СИСТЕМАТИКА НАДВИДОВОГО КОМПЛЕКСА ТАКЫРНОЙ КРУГЛОГОЛОВКИ *Phrynocephalus superspecies helioscopus* (Pallas, 1771) (Reptilia: Agamidae)

© 2010 г. Е. Н. Соловьева¹, Н. А. Поярков¹, Е. А. Дунаев², Т. Н. Дуйсебаева³, А. А. Банникова¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, кафедра зоологии позвоночных, Москва 119991
e-mail: anolis@yandex.ru²Зоологический музей Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 125009³Институт зоологии, Алматы 480060, Казахстан

Поступила в редакцию 20.09.2010 г.

Изложены результаты изучения изменчивости фрагмента гена субъединицы I цитохром с оксидазы митохондриальной ДНК и фингерпринтного анализа ядерной ДНК (по методу Inter-SINE-PCR) надвидового комплекса такырной круглоголовки *Phrynocephalus superspecies helioscopus*, населяющего преимущественно Среднюю Азию и Средний Восток. Согласно результатам молекулярно-генетического анализа образцов тканей 86 особей из 53 популяций, в полной мере представляющих собой различные части ареала видового комплекса, была выявлена неожиданно глубокая дифференциация. Исследованные популяции распались на 12 обособленных филогрупп, многие из которых узкоареальны и генетически обособлены. Поддерживается монофилия такырной (*Ph. helioscopus*) и персидской (*Ph. persicus*) круглоголовок, однако оба эти вида, вероятно, представляют собой сложные надвидовые комплексы. Обсуждаются вопросы зоогеографии Средней Азии.

Такырные круглоголовки *Phrynocephalus superspecies helioscopus* – широкоареальный видовой комплекс, встречающийся на территории Средней Азии, Северо-Западного Китая, Северного Ирана и Закавказья [1] (далее указываем как комплекс *helioscopus–persicus*). С момента первоописания (P.S. Pallas, 1771 г.) до настоящего времени специалистам не удалось сформировать устойчивого взгляда на его филогению. Для решения этой задачи использовались преимущественно морфологические признаки, показатели которых очень сильно перекрываются по своим значениям. Такырные круглоголовки обладают полиморфизмом как по числу хромосом, так и по соотношению макро- и микрохромосом [2–4]. Анцестральным для *Ph. helioscopus* В.К. Еремченко и А.М. Панфилов [5] считают кариотип из 48 хромосом (M/m = 24/24). Наиболее отличающимся от этого варианта оказался кариотип закавказской круглоголовки (*Ph. persicus horvathi*). Популяции собственно такырной круглоголовки (*Ph. helioscopus*) не различаются по теплоустойчивости мышечной ткани, однако *Ph. p. horvathi* с юга Азербайджана (в отличие от армянских популяций) обладает такими же цитофизиологическими характеристиками, что и *Ph. helioscopus* из Средней Азии [6].

С развитием молекулярно-генетических методов появилась возможность упорядочить представления о системе надвидового комплекса *Ph. helioscopus–Ph. persicus*. Однако работ по генетической изменчивости этой группы немного и в

них обсуждается от трех [5, 7] до 5–12 [8–14] филогенетических клад. Итак, по современным представлениям внутри вида *Phrynocephalus helioscopus* выделяют три подвида: *Ph. helioscopus helioscopus*, *Ph. h. saidalievi* и *Ph. h. varius*, а внутри *Phrynocephalus persicus* – два: *Ph. p. persicus* и *Ph. p. horvathi*. В целом таксономические взаимоотношения внутри видового комплекса такырных круглоголовок остаются неразрешенными.

Поскольку ареал такырных и персидских круглоголовок охватывает почти всю Среднюю Азию и прилегающие территории, мы полагаем, что исследование филогенетических взаимоотношений внутри этого широкоареального комплекса может пролить свет на события, повлиявшие на расселение и видообразование множества других организмов, обитающих в этом регионе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика материала

В молекулярно-генетическом анализе использованы образцы тканей 86 особей *Phrynocephalus helioscopus* из 53 популяций со всего ареала (рис. 1, табл. 1), а также по одному образцу ткани *Ph. axillaris* (ZMMU R-12302), *Ph. mystaceus* (ZMMU R-12149) и *Ph. interscapularis* (ZMMU R-12260) – в качестве внешних групп. Исследованные экземпляры депонированы преимущественно в герпетологических коллекциях Научно-исследовательского зоологического музея Московского го-

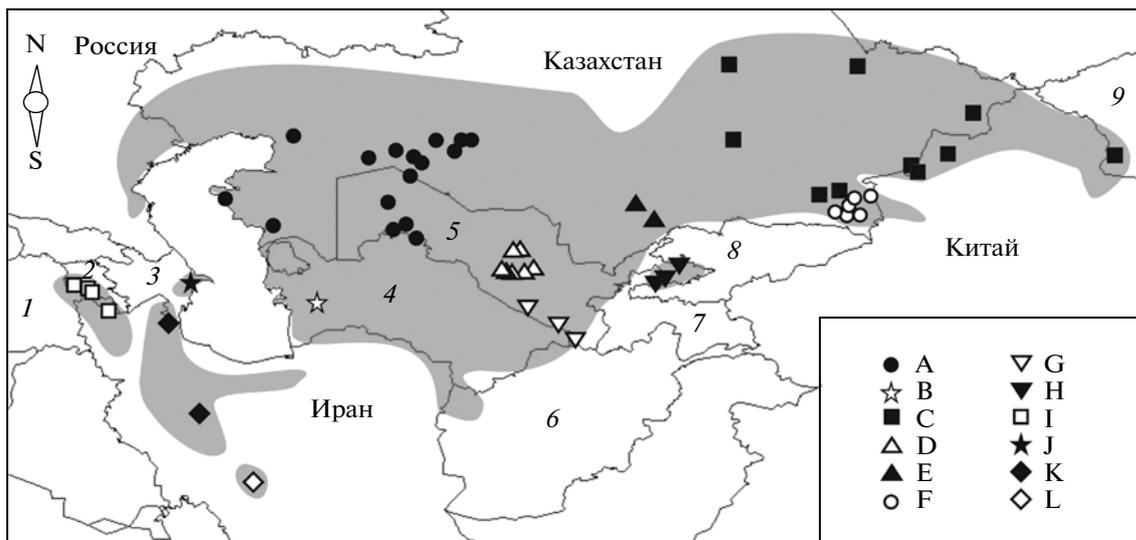


Рис. 1. Распространение современных таксонов комплекса *Ph. helioscopus* (значками обозначены места сбора образцов, использованных в молекулярном анализе, буквы соответствуют выявленным филогруппам, см. табл. 1). Цифрами отмечены следующие страны: 1 – Турция, 2 – Армения, 3 – Азербайджан, 4 – Туркменистан, 5 – Узбекистан, 6 – Афганистан, 7 – Таджикистан, 8 – Киргизия, 9 – Монголия.

сударственного университета (ZMMU, 70 экз.) и Института зоологии и паразитологии АН Узбекистана (IZIP, 3 экз.). Ряд образцов любезно предоставлен нам коллегами.

В ходе молекулярного анализа сравнивали последовательности фрагментов митохондриального гена субъединицы I цитохром c оксидазы (*COI*), а также фингерпринты ядерной ДНК по методу Inter-SINE-PCR. В анализ Inter-SINE-PCR по системе праймеров MIR-MIL вошли 33 экземпляра, а по системе праймеров OMIR-OMIL – 31 экземпляр. В общую матрицу, объединяющую данные по двум системам праймеров, вошли, таким образом, данные по 25 экземплярам, представляющим 11 популяций со всего ареала комплекса *helioscopus-persicus*.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из печени и мышечной ткани, хранившихся в 70%-ном или 96%-ном этаноле, или из высушенных шкурок. Использовали набор реагентов для выделения ДНК Diatom DNA Prep 200 (Isogene Lab Ltd.) или же проводили инкубацию в присутствии протеиназы-K и выделяли стандартным фенол-хлороформным методом с последующим осаждением изопропанолом [15].

Аmplификация и секвенирование митохондриальной ДНК

В полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры и сухой набор реагентов для ПЦР-амплификации ДНК (GenePak PCR CoE, Isogene

Lab Ltd.). В пробирку MasterMix, уже содержащую лиофилизированные ингредиенты (200 мкМ dNTP, ингибированную до “горячего старта” *Taq*-полимеразу, 2.5 мМ MgCl₂, оптимизированный буфер и краску), добавляли 10 мкл специального растворителя Diluent, 5 мкл смеси праймеров с концентрацией 1 о.е./мкл и 5 мкл раствора ДНК. Амплификацию проводили на аппарате MyCycler Bio-Rad. ПЦР осуществляли с использованием стандартной для низших позвоночных пары праймеров: VF1d (5'-TTCTCAACCAACCACAA(R)GA(Y)AT(Y)GG-3') и VR1 (5'-TAGACTTCTGGGTGGCC(R)AA(R)AA(Y)-3') [16]. Длина амплифицированного фрагмента ДНК составила 680 пн.

Использовался следующий протокол амплификации гена *COI*: предварительная денатурация – 94°C, 1 мин; денатурация – 94°C, 30 с; элонгация при 72°C – 1 мин. Условия отжига менялись: первые пять циклов отжиг шел 40 с при 45°C, а следующие 30–35 циклов – 53°C 40 с. Дополнительная элонгация при 72°C – 10 мин. Амплификацию контролировали с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Последовательности фрагмента гена *COI* ряда образцов (всего 68) определяли с помощью прямого секвенирования в Canadian Center of DNA Barcoding (Canada) по методике Н.В. Ивановой с соавт. [16]; часть образцов (всего 37) были отсеквенированы в лаборатории Центра молекулярной диагностики ФГУ ВГНКИ и в ЦКП “Геном” с помощью автоматических секвенаторов ABI 377 и ABI 3100-Avant, а также ABI PRISM® BigDye™ Terminator, version 3.1 и наборов реагентов Big-Dye Ready-Reaction kit (USA).

Таблица 1. Список образцов *Ph. helioscopus* и *Ph. persicus*, использованных в молекулярно-филогенетическом анализе

№	Локалитет	Инвентарные номера	N
А – Узбекистан: Каракалпакия; Зап. Казахстан: Приаралье, Устюрт, Сев.-Зап. Кызылкумы (N = 30)			
1	Узбекистан, Кунградский р-н, окр. пос. Раушан; N42.933, E59.133	IZIP 829(4401) R-12150	2
2	Узбекистан, Устюрт, пос. Жаслык; 43.933, E57.498	IZIP 003	1
3	Узбекистан, Кунградский р-н, юго-зап. г. Кунград; N42.683, E58.550	R-12152	1
4	Узбекистан, Кунградский район, Устюрт; N43.991, E57.972	R-12153	2
5	Узбекистан, Арал, о-в Возрождения; N45.167, E59.333	R-12813	1
6	Казахстан, Кызылординская обл., трасса Аральск–Камышлыбаш; N46.228, E61.367	R-13241	1
7	Казахстан, Кызылординская обл., окр. г. Аральск; N46.800, E61.667	R-13242	5
8	Казахстан, Кызылординская обл., вост. г. Аральск; N46.794, E62.133	R-13240	3
9	Казахстан, Мангистауская обл., пос. Озектык; N45.983, E57.467	R-12151, R-12155	3
10	Казахстан, Мангистауская обл., п-ов Мангышлак; N44.100, E50.950	R-12157	1
11	Казахстан, Кызылординская обл., пески Бол. Барсуки; N46.283, E58.700	R-12158	1
12	Казахстан, Кызылординская обл., пос. Акеспе; 46.783, 60.500	R-12156, R-12160	3
13	Казахстан, Кызылординская обл., Арал, п-ов Куланды; N46.017, E59.500	R-12162	1
14	Казахстан, Кызылординская обл., о-в Барса-Кельмес; N45.700, E59.867	R-12519	1
15	Казахстан, Мангистауский р-н, Устюртский заповедник; N42.883, E53.083	R-12525	1
16	Казахстан, Жамбылская обл., окр. пос. Кызыл-Кия; N41.650, E69.367	R-12161	2
17	Казахстан, Карагандинская обл., сев. пос. Жанакала; N50.217, E73.817	R-12527	1
В – Зап. Туркменистан: окрестности Небит-Дага (N = 1)			
18	Туркмения, 70 км от пос. Небит-Даг к г. Ашхабад; N39.350, E55.200	R-12789	1
С – Вост. Казахстан, Китайская и Монгольская Джунгария (N = 9)			
19	Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., горы Семей-Тау; N50.150, E79.667	R-12163	2
20	Казахстан, Восточно-Казахстанская обл., окр. оз. Жаланашколь; N45.571, E82.212	R-12164, R-12524	2
21	Казахстан, Алматинская обл., сев. часть Илийской котловины; N44.167, E78.783	R-12810	2
22	Китай, Синьцзян-Уйгурский АР, окр. Толи	R-13089	1
23	Монголия, Ховд, Икчер-Толи, зап от Булган; N46.100, E91.350	R-12903	2
Д – Сев.-Вост. Узбекистан (N = 7)			
24	Узбекистан, Бухарская обл., окр. оз. Аякагытма; N40.667, E64.483	R-12166	1
25	Узбекистан, Навоийская обл., центр. Кызыл-Кумы; N41.650, E64.300	R-12167	1
26	Узбекистан, Навоийская обл., сев.-зап. г. Зафарабат; N40.850, E64.933	R-12259	1
27	Узбекистан, Навоийская обл., сев.-вост. г. Заравшан; N41.700, E64.033	R-12264	1
28	Узбекистан, Навоийская обл., окр. пос. Шурук; N40.683, E63.8	R-12281	1
29	Узбекистан, Навоийская обл., близ пос. Джангельды; N40.800, E63.600	R-12286	1
30	Узбекистан, Навоийская обл., шлейф Кульджуктау; N40.836, E63.483	R-12310	1
Е – Сев. Каратау (N = 2)			
31	Казахстан, Жамбылская обл., окр. пос. Сузак; N44.133, E68.467	R-12662	1
32	Казахстан, Жамбылская обл., окр. оз. Кызылколь; N43.784, E69.553	R-12165	1
Ф – Илийская котловина (N = 10)			
33	Казахстан, Алматинская обл., дорога на пос. Кеген; N43.346, E79.22	–	2
34	Казахстан, Алматинская обл., сев. Сюгатинской долины	–	1
35	Казахстан, Алматинская обл., юж. часть Илийской котловины; N43.600, E79.317	R-12664	1

Таблица. Продолжение

№	Локалитет	Инвентарные номера	N
36	Казахстан, Алматинская обл., окр. пос. Хоргос; N44.217, E80.250	R-12665	2
37	Казахстан, Алматинская обл., окр. пос. Ташкарасу; N43.733, E79.467	R-12668	1
38	Казахстан, Алматинская обл., Сюгатинская долина; N43.450, E78.900	R-12669	2
39	Казахстан, Алматинская обл., вост. холмов Актау; N44.083, E79.467	R-12812	1
G – Сев.-Вост. Туркмения, Юго-Вост. Узбекистан (N = 5)			
40	Узбекистан, Сурхандарьинская обл., Пашхурдская степь; N37.583, E66.667	R-12801	2
41	Узбекистан, Бухарская обл., окр. Бухарского питомника “Джейран”; N39.567, E64.767	R-12803	1
42	Узбекистан, граница Бухарской и Кашкадарьинской обл., окр. оз. Девхона; N39.200, E64.650	R-12804	2
H – Ферганская долина (N = 4)			
43	Узбекистан, Ферганская обл., 25 км сев. г. Коканд; N40.767, E70.967	R-12678	1
44	Узбекистан, Ферганская обл., окр. г. Коканд; N40.517, E70.933	R-12802	3
I – Закавказье (N = 9)			
45	Армения, Армавирский марз, пос. Горован; N39.917, E44.733	R-13243	4
46	Армения, Армавирский марз, окр. г. Армавир; N40.067, E44.050	–	2
47	Армения, Армавирский марз, окр. пос. Октемберян; N40.150, E44.033	R-12322	1
48	Армения, Армавирский марз, окр. пос. Веди; N39.933, E44.717	R-3843	1
49	Азербайджан, окр. г. Нахичевань; N39.217, E45.417	R-12466	1
J – Апшеронский п-ов (N = 1)			
50	Азербайджан, Апшеронский п-ов, окр. пос. Сангачалы; N40.167, E49.450	R-12786	1
K – Сев. и Центр. Иран (N = 2)			
51	Иран, пров. Маркази, окр. г. Арак; N34.240, E49.750	–	1
52	Иран, пров. Вост. Азербайджан, окр. г. Ардебиль; N38.393, E48.368	–	1
L – окрестности Абадэ (N = 2)			
53	Иран, пров. Фарс, окр. г. Абадэ; N31.129, E52.203	–	2

Примечание. N – число экземпляров. Указаны инвентарные номера коллекций: R – герпетологическая коллекция ЗММГУ (ZMMU), Москва; IZIP – коллекция Института зоологии и паразитологии, Ташкент.

При секвенировании использовали 10–40 нг очищенного ПЦР-продукта и те же праймеры, что и при проведении амплификации.

Условия Inter-SINE-PCR

Метод Inter-SINE-PCR основан на анализе полиморфизма длин участков ДНК, расположенных между копиями коротких ретропозонов (SINEs). В данной работе изучали семейство SINEs, ранее успешно использованное в филогенетических исследованиях млекопитающих, а именно MIR (mammalian interspersed repeat), которое имеется, по-видимому, у всех позвоночных [17, 18]. Амплификацию проводили с использованием праймеров, комплементарных наиболее консервативному центральному участку элемента MIR [18]: O-MIR (5'-ACSTTGAGCAAGTCACT-3') и O-MIL (5'-CGGAGTCAAAGGAGTAG-3'), а также праймеров

MIR (5'-AGTGACTTGCTCAAGGT-3') и MIL (5'-GCCTCAGTTTCCTCATC-3'). Условия метода Inter-SINE-PCR и проведения анализа данных описаны у А.А. Банниковой и соавт. [17].

Филогенетический анализ результатов секвенирования COI

В общей сложности последовательности фрагмента гена COI длиной 680 пн были получены для 77 образцов (номера генбанка NCBI JF756679–JF756689, JF769363–JF769421). Нуклеотидные последовательности выравнивались вручную с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor 5.0.9 [19]. Окончательное выравнивание, использованное в филогенетическом анализе, имело общую длину 662 пн.

Филогенетический анализ проводили в программах PAUP version 4.0b4a [20] и MEGA 4.0 [21].

Таблица 2. Генетическое (π – нуклеотидное, H – гаплотипическое) разнообразие и замены (Ti – транзиции, Tv – трансверсии) в некоторых исследованных филогруппах (1, линии F, C, A, D, H и I) и географических популяциях (2, указаны номера популяций из табл. 1 и число особей)

(1)	A ($N=30$)	C ($N=9$)	D ($N=7$)	F ($N=9$)	H ($N=4$)	I ($N=9$)
π	0.38	0.84	0.16	1.29	0.20	1.21
H	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
(2)	Армения (45–48; $N=8$)	Вост. Казахстан и Джунгария (19–23; $N=9$)	Приаралье (6–8, 11–14; $N=15$)	Устюрт (1–4, 9–10, 15; $N=11$)	Левый берег р. Или (33–35, 37, 38; $N=7$)	Узбекистан (24–30; $N=7$)
π	0.00	0.92	0.28	0.35	0.69	0.17
H	0.71	0.96	0.95	0.91	1.00	0.81
Ti	0	18	6	6	7	3
Tv	0	5	2	3	9	0

Были получены дендрограммы по методу ближайшего соседа (NJ-дендрограммы) с использованием дистанций модели максимального правдоподобия (Maximum Composite Likelihood) с учетом транзиций, трансверсий и всех кодирующих позиций. Также строили кладограммы с помощью алгоритма максимальной экономии Вагнера (Maximum Parsimony, MP-кладограммы).

Филогенетический анализ результатов Inter-SINE-PCR

Фингерпринты, полученные в MIR- и MIL-Inter-SINE-PCR, были преобразованы в бинарные матрицы (1 – присутствие, 0 – отсутствие полосы), которые анализировали в пакете PAUP version 4.0b4a [20] по методу ближайшего соседа (Neighbour-Joining) на основе генетических дистанций Нея и Ли (D_{NL}) [22], а также методом максимальной экономии Вагнера (Maximum Parsimony). Для оценки статистической достоверности полученных группировок проводили бутстрэп-анализ (BS), в ходе которого осуществляли 1000 повторов. Всего построено три NJ-дендрограммы: по результатам использования первой системы праймеров, по результатам использования второй системы праймеров и суммарная дендрограмма, обобщающая результаты анализа обеих систем праймеров (в суммарной матрице общее число признаков составило 332). Достоверность полученных в результате анализа профилей Inter-SINE-PCR группировок также оценивали с помощью многомерного шкалирования на основе генетических дистанций Нея и Ли (D_{NL}) [22] с использованием пакета программ STATISTICA [23].

Оценка генетического разнообразия

Для оценки вклада внутригрупповой и межгрупповой изменчивости в общую изменчивость вида проводили анализ молекулярного разнооб-

разия AMOVA [24]. Распределение частот попарных нуклеотидных различий (mismatch distribution) и показатели нуклеотидного (π) и гаплотипического (H) разнообразия рассчитаны при помощи программы Arlequin ver. 3.5.1.2 [25]. Нуклеотидное разнообразие (π) вычислялось по формуле $\pi = (\theta_{\pi}/N_{nu}) \times 100\%$, где θ_{π} – популяционный параметр θ , вычисляемый по среднему числу попарных различий [26], а N_{nu} – число нуклеотидов ($N_{nu} = 656$). Также для всех последовательностей было определено число полиморфных локусов.

Для проведения расчета ряда популяционно-генетических показателей общая выборка, представленная 53 популяциями комплекса *helioscopus-persicus*, подразделялась нами на отдельные группы, примерно соответствующие географическим популяциям круглоголовков. При этом придерживались следующих принципов: в группу входили выборки, относящиеся к одному кластеру гаплотипов, из географически близких популяций, не разделенных преградами, заведомо являющимися барьерами для распространения круглоголовков (такими, как горные хребты, русла крупных рек и т.д.). В общей сложности было выделено шесть групп (см. табл. 2), объединяющих популяции долины р. Аракс в Армении (четыре популяции, линия I), Восточного Казахстана и прилегающих районов Синьцзян-Уйгурского А.Р. КНР (пять популяций, линия C), Приаралья (шесть популяций, линия A), Устюрта (семь популяций, линия A), Центрального Узбекистана (семь популяций, линия D) и левобережья р. Или в Илийской котловине (пять популяций, линия F). Размер анализируемых группировок колеблется незначительно (от семи до 16 экз.), что в целом позволяет сравнивать результаты расчетов для отдельных групп.

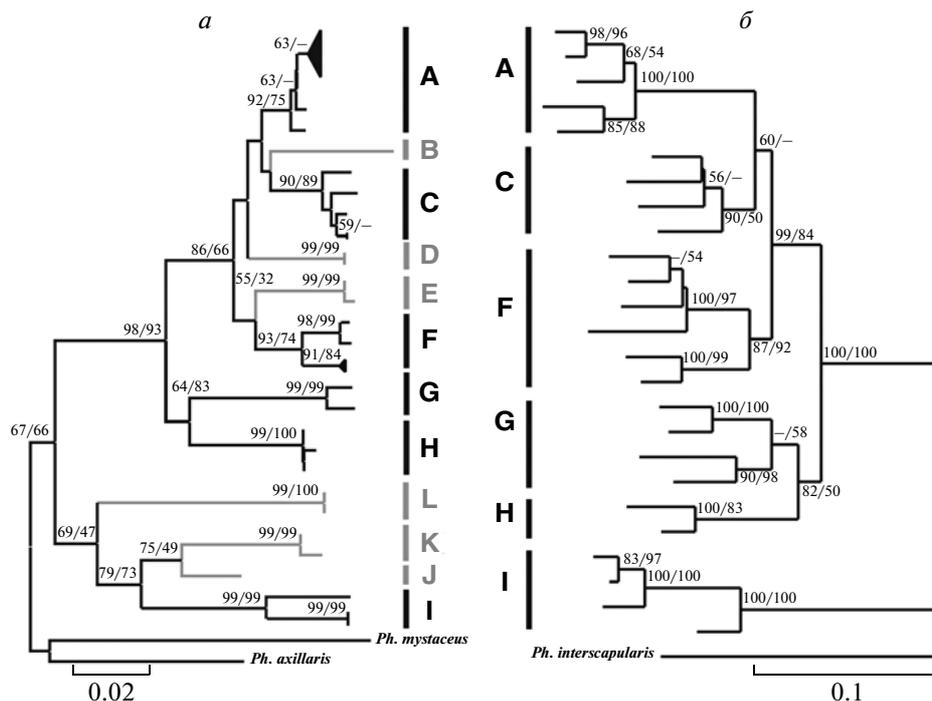


Рис. 2. Схемы молекулярно-генетических взаимоотношений представителей комплекса *Ph. helioscopus* по данным анализа мтДНК- и яДНК-маркеров. *a* – NJ-дендрограмма по фрагментам последовательностей гена *COI*; *б* – суммарная NJ-дендрограмма на основе генетических дистанций Нея и Ли по результатам анализа Inter-SINE-PCR. Для кластеров, статистическая достоверность которых выше 50%, указаны индексы бутстрэп-поддержки (% от 1000 повторов): перед косой чертой – в анализе по методу ближайшего соседа (NJ), после косой черты – в парсимониальном анализе (MP). Буквенные обозначения группировок соответствуют указанным в табл. 1: **A** – Сев.-Зап. Узбекистан; Зап. Казахстан: Приаралье, Устюрт, Сев.-Зап. Кызылкумы; **B** – Зап. Туркмения: Небит-Даг; **C** – Вост. Казахстан, Китайская и Монгольская Джунгария; **D** – Сев.-Вост. Узбекистан; **E** – Казахстан: Сев. Каратау; **F** – Вост. Казахстан: Илийская котловина; **G** – Юго-Вост. Узбекистан: Сурхандарья и юг Бухарской обл.; **H** – Узбекистан: Ферганская долина; **I** – Армения; Азербайджан, г. Нахичевань; **J** – Азербайджан: Апшеронский п-ов; **K** – Сев. и Центр. Иран: Ардебиль и Арак; **L** – Южный Иран: Абадэ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика последовательностей мтДНК

Содержание нуклеотида гуанина в изученном фрагменте гена *COI* снижено, что характерно для митохондриальной ДНК: Т – 28.10%, А – 30.84%, Г – 13.45%, Ц – 27.60%. Из 656 пн фрагмента гена *COI* 249 были вариабельными и 181 оказалась парсимониально-информативной. Общее число замен – 293, из них 98 трансверсий и 195 транзиций. Число транзиций превышает число трансверсий в большинстве исследованных популяций (см. табл. 2).

Филогенетический анализ мтДНК

Наше исследование выявило значительную структурированность митохондриального генофонда круглоголовых комплекса *helioscopus–persicus*. На топологически идентичных MP- и NJ-дендрограммах, построенных в результате филогенетического анализа фрагмента гена *COI* (рис. 2, *a*), выделяется не менее 15 монофилетических кластеров гаплотипов с высокими и средними уровнями

бутстрэп-поддержки (90–99% для NJ-, 75–100% для MP-анализа). Средние некорректированные *p*-дистанции (в %) между выявленными линиями представлены в табл. 3. Уровни генетической обособленности кластеров весьма различны. В общей сложности их можно объединить в 12 монофилетических линий (обозначенных А–L), средние некорректированные *p*-дистанции между которыми превышают условный уровень $p = 4.0\%$ (см. табл. 3). При этом максимальный уровень внутригрупповой изменчивости не превышает уровень $p = 1.4\%$ (для линии G). Определенный интерес представляет собой линия F из Илийской котловины, представленная двумя значительно обособленными достоверно монофилетическими субкладами F₁ и F₂ ($p = 3.0\%$; см. табл. 3), разделенными руслом *p*. Или. В целом мы можем заключить, что уровни внутригрупповой изменчивости по исследованному маркеру мтДНК у комплекса такрыных круглоголовых значительно ниже, чем для межгрупповых сравнений, и не перекрываются с ними.

Таблица 3. Средние некорректированные p -дистанции (в %) по данным анализа последовательностей фрагмента гена *COI*: (1) p -дистанции между линиями комплекса *Ph. helioscopus*–*Ph. persicus* (под диагональю); (2) p -дистанции между некоторыми видами рода *Phrynocephalus* (под диагональю). Над диагональю показано стандартное отклонение, на диагонали – средние некорректированные внутригрупповые p -дистанции (выделены полужирным шрифтом)

(1)	Линия	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	<i>Ph. mystaceus</i>	–	2.4	2.8	2.8	2.5	2.5	2.8	2.8	2.4	3.0	2.8	2.8	2.6	2.6	2.6
2	<i>Ph. axillaris</i>	13.7	–	2.3	2.1	2.2	2.2	2.1	2.1	2.3	2.4	2.3	2.5	2.4	2.4	2.2
3	К	17.9	14.0	0.6	2.1	1.2	1.7	2.4	2.3	2.2	2.3	2.3	2.2	2.4	2.1	2.3
4	L	17.7	12.1	12.0	0.0	1.9	2.0	2.4	2.2	2.3	2.4	2.3	2.3	2.5	2.5	2.4
5	J	14.6	13.7	14.0	13.8	–	1.5	2.2	2.1	1.9	2.0	1.9	2.0	2.2	2.0	2.2
6	I	15.5	14.5	9.0	12.6	8.3	1.0	2.3	2.2	2.1	2.3	2.4	2.2	2.4	2.4	2.4
7	G	17.1	12.4	15.0	15.7	13.4	13.7	1.4	1.5	2.0	1.8	1.9	1.9	2.0	1.7	1.7
8	H	17.5	13.1	15.0	13.9	14.0	14.8	7.5	0.2	1.8	1.6	1.6	1.8	1.8	1.7	1.6
9	E	14.8	12.4	5.0	9.7	11.2	8.4	14.0	13.4	0.3	1.3	1.1	1.3	1.4	1.3	1.2
10	F ₁	19.3	14.9	14.0	14.7	11.0	15.2	10.1	7.7	11.0	0.6	0.8	1.3	1.4	1.3	1.3
11	F ₂	17.5	14.2	14.0	14.0	11.1	15.6	10.8	8.1	11.1	3.0	0.2	1.1	1.3	1.2	1.2
12	D	18.3	15.3	14.0	14.4	11.7	14.0	10.6	9.0	11.8	5.0	5.0	0.0	1.4	1.3	1.2
13	B	16.6	14.7	15.0	15.5	12.5	15.3	11.1	10.1	12.5	7.0	6.0	6.0	–	1.1	1.2
14	C	16.4	14.7	14.0	15.8	11.8	16.1	10.0	9.1	11.7	6.0	6.0	6.0	5.0	0.8	1.0
15	A	16.9	13.1	14.0	14.5	12.9	15.5	8.8	7.9	12.9	6.0	5.0	5.0	5.0	4.0	0.5
(2)	Вид	1			2			3			4					
1	<i>Ph. helioscopus</i>	4.3			2.0			2.0			2.5					
2	<i>Ph. persicus</i>	14.8			6.3			2.0			2.3					
3	<i>Ph. mystaceus</i>	17.1			16.1			–			2.2					
4	<i>Ph. axillaris</i>	13.8			13.9			13.7			–					

Примечание. Клада F из долины р. Или в анализе разделена на две субклады – F₁ (популяции с правого берега р. Или) и F₂ (популяции с левого берега р. Или).

В пределах комплекса такырных круглоголовок выделяются два достоверно монофилетических кластера, соответствующих двум признаваемым сегодня видам комплекса – *Ph. helioscopus* с территории Средней и Центральной Азии и Предкавказья и *Ph. persicus* с территории Иранского и Армянского нагорий. Их генетическая обособленность весьма значительна ($p = 14.8\%$). При этом средние некорректированные p -дистанции между линиями комплекса такырных круглоголовок и внешними группами (другими представителями рода *Phrynocephalus*) колеблются от 12.1% до 19.3%. Межвидовые дистанции между разными группами собственно такырных круглоголовок и между разными группами персидских варьируют от 5.0% (между филогруппами E и K) до 16.1% (между C и I). Перекрывание значений генетических дистанций между видами комплекса *helioscopus*–*persicus* и другими видами рода *Phrynocephalus* связано, по всей вероятности, с насыщением относительно быстро эволюционирующего гена *COI*, что, однако, не столь суще-

ственно при изучении филогенетических связей внутри комплекса.

Итак, в составе *Ph. helioscopus* и *Ph. persicus* мы выделяем 12 митохондриальных линий, распространение каждой из которых рассматривается в разделе “Обсуждение”. Широкоареальный вид *Ph. helioscopus* представлен двумя кластерами, объединяющими восемь линий гаплотипов, из которых шесть (A–F; см. рис. 1; рис. 2,а) населяют северную и центральную часть видового ареала, а две другие (G и H) встречаются в его южной части. Хотя поддержка монофилии двух этих кластеров невысока (см. рис. 2,а), мы далее обозначаем их как, соответственно, “северные” и “южные” популяции такырных круглоголовок. Наименьшая средняя p -дистанция для собственно такырных круглоголовок – 3.0% (между популяциями правого (F₁) и левого (F₂) берегов р. Или), а максимальная – 12.5% (между образцом из Нейбит-Дага (B) и популяциями из Северного Каратау (E)). Вид *Ph. persicus*, для которого характерен ареал, состоящий из изолированных популяций,

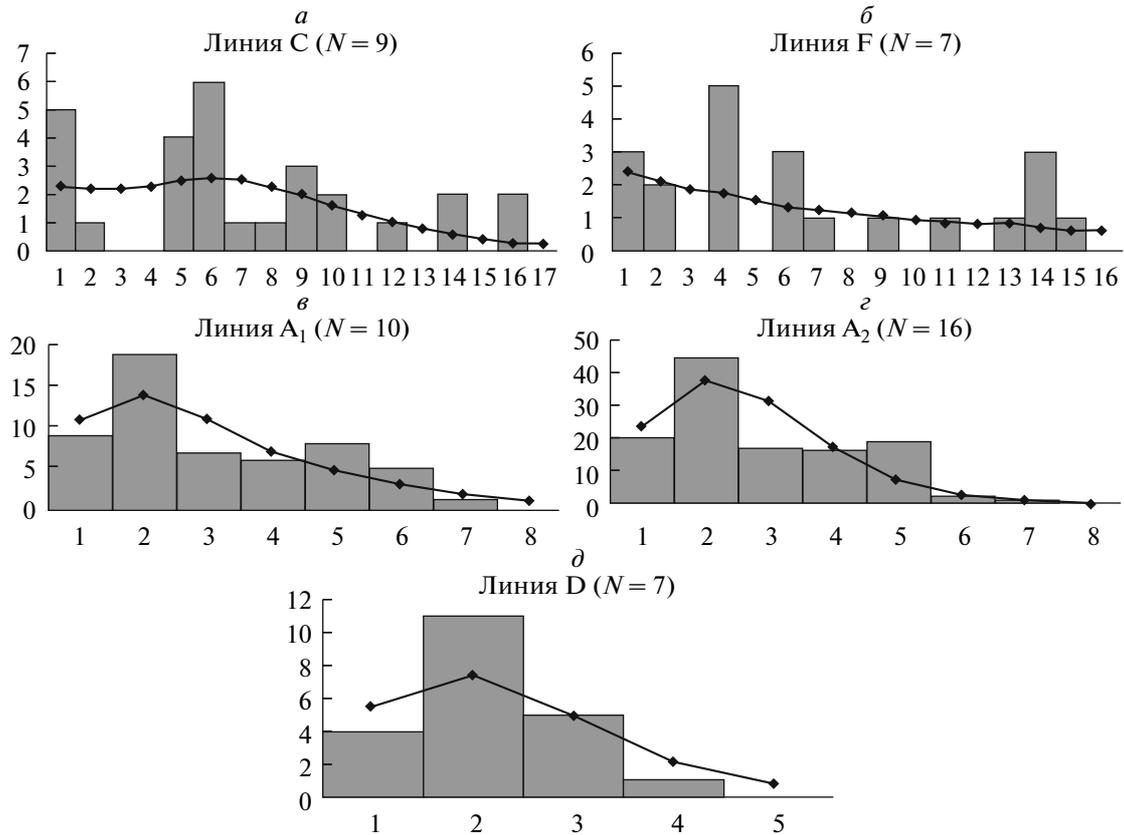


Рис. 3. Анализ распределения попарных нуклеотидных различий (столбцы гистограммы – наблюдаемое распределение, кривая – ожидаемое; над графиками указано число включенных в анализ особей): *a* – Вост. Казахстан и Джунгария (C), *б* – левый берег р. Или (F), *е* – Устьурт (A₁), *з* – Приаралье (A₂), *д* – Сев.-Вост. Узбекистан (D). По оси абсцисс – число попарных различий; по оси ординат – частота встречаемости.

представлен в нашем исследовании четырьмя линиями гаплотипов (I–L; см. рис. 1; рис. 2,а). Генетическая обособленность этих линий весьма значительна (*p*-расстояния между линиями высокие и колеблются от 9.0% до 14.0%; средняя некорректированная внутригрупповая *p*-расстояние для вида составила 6.3%; см. табл. 3) и заметно выше, чем в случае *Ph. helioscopus*.

Генетическое разнообразие выявленных линий

Средняя некорректированная *p*-расстояние всего комплекса такырных круглоголовков по фрагменту гена *COI* составила 7.6%. Согласно результатам AMOVA вклад межгрупповой изменчивости в генетическое разнообразие (92.7%) многократно превышает вклад внутригрупповой из-

Таблица 4. Средние генетические дистанции Нея и Ли (D_{NL}) между линиями комплекса *Ph. helioscopus*–*Ph. persicus* по данным Inter-SINE-PCR-анализа (объединенная матрица по системам праймеров MIR-MIL и OMIR-OMIL). Под диагональю показаны средние межгрупповые генетические дистанции, а на диагонали – средние внутригрупповые генетические дистанции (выделено полужирным шрифтом)

	<i>Ph.int.</i>	F	C	A	H	G	I
<i>Ph.int.</i>	–	–	–	–	–	–	–
F	1.65	0.30	–	–	–	–	–
C	1.89	0.44	0.21	–	–	–	–
A	1.76	0.59	0.46	0.16	–	–	–
H	1.52	0.61	0.61	0.68	0.13	–	–
G	1.57	0.70	0.63	0.68	0.49	0.25	–
I	1.24	1.18	1.22	1.26	1.20	1.25	0.11

менчивости (1.9% между популяциями внутри групп и 5.4% внутри популяций внутри групп).

Нуклеотидное разнообразие (π) наиболее высоко в популяциях Вост. Казахстана и Джунгарии (С) (0.92), на остальной территории оно довольно невелико и колеблется между 0.17 и 0.69 (табл. 2, (1)). Гаплотипическое разнообразие (H) колеблется от 0.71 (в группе I) до 1 (в группе F), т.е. большинство исследованных нами особей имели уникальные гаплотипы. Если рассматривать филогруппы в целом, то самое высокое значение π отмечено для филогрупп F (1.29) и I (1.21).

Распределение частот попарных нуклеотидных различий

Распределение частот попарных нуклеотидных различий (mismatch distribution) имеет явно уни-модальный характер в трех кластерах гаплотипов (рис. 3). Это популяции из Сев.-Вост. Узбекистана (линия D) (рис.3,д), а также принадлежащие номинативному подвиду *Ph. h. helioscopus* (линия А) популяции Устюрта и Приаралья (рис. 3,в, з). Этот результат предполагает возможность, по-видимому, недавней демографической экспансии или серии экспансий, сопровождающейся экспоненциальным ростом численности и высокой скоростью миграций между соседними популяциями [27–29]. Между тем, для изолированных популяций долины реки Или (линия F), ограниченной с севера Джунгарским Алатау, с востока хребтом Боро-хоро, а с юга хребтами Заилийский Алатау и Кетмень, показан мультимодальный характер распределения попарных нуклеотидных сравнений (рис. 3,б). Эта картина предполагает наличие демографического равновесия, т.е. длительной популяционной стабильности и отсутствия экспоненциального роста численности популяции. Мультимодальная картина распределения попарных различий выявлена также для популяций линии С (*Ph. h. varius*), которые, в отличие от популяций линии F, населяют достаточно обширную территорию от Прибалхашья до Монгольской Джунгарии. Однако в гистограмме распределения попарных нуклеотидных различий для гаплотипов этой линии (рис. 3,а) наблюдается пик в области значений 5–6 (число различий), что не исключает возможность популяционной экспансии в недавнем прошлом.

Филогенетический анализ результатов Inter-SINE-PCR

В спектре продуктов ПЦР с системой праймеров MIR-MIL было выявлено 185 фрагментов, а с праймерами OMIR-OMIL – 147 фрагментов. Дистанционные и парсимониальные дендрограммы, построенные по результатам анализа Inter-MIR- и Inter-OMIR-PCR, сходным образом группируют

исследованные образцы в шесть статистически достоверных ($BS > 75\%$) группировок (в анализ вошли представители линий А, С, F, G, H, I). Сходство заключается также в том, что обе системы праймеров демонстрируют подразделение выборки на две основные группировки, объединяющие, соответственно, образцы *Ph. helioscopus* (линии А–H) и *Ph. persicus* (линия I). Молекулярно-генетические взаимоотношения между отдельными линиями в составе *Ph. helioscopus* (линии А–H) по данным анализа систем праймеров Inter-MIR- и Inter-OMIR-PCR в ряде узлов разрешены различным образом. Поскольку значения бутстрэп-поддержек для этих группировок невелики (и заметно ниже уровней поддержки, полученных в результате анализа суммарной матрицы), мы сочли возможным считать разницу между результатами Inter-MIR- и Inter-OMIR-PCR несущественной и объединить бинарные матрицы и обсуждать далее суммарную матрицу Inter-SINE-PCR.

В таблице 4 показаны значения генетических дистанций Нея и Ли (D_{NL}) между исследованными линиями комплекса *helioscopus–persicus* и внешней группой (*Ph. interscapularis*) по данным Inter-SINE-PCR-анализа суммарной матрицы по системам праймеров MIR-MIL/OMIR-OMIL. Внутригрупповые генетические дистанции по всем выявленным шести группировкам варьируют в пределах 0.11–0.30 (среднее значение $D_{NL} = 0.19 \pm 0.07$), в то время как генетические дистанции между отдельными линиями *Ph. helioscopus* изменяются от 0.44 (между линиями F и C) до 0.70 (между линиями F и G) (среднее значение $D_{NL} = 0.59 \pm 0.09$). Персидские круглоголовки в анализе Inter-SINE-PCR были представлены лишь одной популяцией, в связи с чем оценка внутривидовой изменчивости *Ph. persicus* невозможна. Генетические дистанции Нея и Ли между *Ph. helioscopus* и *Ph. persicus* составили $D_{NL} = 1.22 \pm 0.03$ (1.18 – 1.26), а между представителями комплекса *helioscopus–persicus* и *Ph. interscapularis* несколько выше и, соответственно, колеблются от 1.24 до 1.89 (среднее значение $D_{NL} = 1.60 \pm 0.22$). Таким образом, диапазоны значений внутригрупповой, межгрупповой и межвидовой изменчивости генетических дистанций Нея и Ли по данным проведенного анализа Inter-SINE-PCR не перекрываются.

Молекулярно-генетические связи исследованных популяций графически отображены на рис. 4, где показаны результаты многомерного шкалирования генетической изменчивости по данным анализа суммарной матрицы Inter-SINE-PCR. Ввиду значительной генетической обособленности отдельных видов круглоголовки и во избежание искажения результатов многомерное шкалирование проводилось лишь для популяций собственно *Ph. helioscopus* с исключением из анализа внешней группы и *Ph. persicus*. Как видно из рис. 4, при сравнении первой и второй шкал изменчиво-

сти все пять включенных в анализ линий такырной круглоголовки хорошо различаются без перекрывания и образуют компактные, заметно отстоящие друг от друга группировки. Незначительное перекрывание наблюдается между относительно более близкими линиями А и F лишь при сравнении первой и третьей шкал изменчивости.

На рис. 2,б представлена суммарная NJ-дендрограмма, построенная по данным анализа двух систем праймеров Inter-SINE-PCR. Топология суммарной парсимониальной (MP, 217 парсимониально информативных от общего числа 332) и дистанционной (NJ) дендрограмм оказалась сходной. В целом она совпадает с топологией, полученной по данным филогенетического анализа мтДНК (за исключением не вошедших в Inter-SINE-PCR анализ линий: клады В, D, E, L, K, J, выделены серым цветом на рис. 2,а). Так, прослеживается четкая тенденция разделения кластера *Ph. helioscopus* на две группы популяций: “северную” (линии А, С и F) и “южную” (линии G и H).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании метод Inter-SINE-PCR впервые применен в изучении филогении и внутривидовой дифференциации агамовых ящериц. Ранее этот метод успешно использовали в исследовании филогении других рептилий [30–32], а также млекопитающих [33, 34]. Результаты анализа Inter-SINE-PCR выявили значительное молекулярное структурирование ядерного генофонда комплекса *helioscopus–persicus*, в значительной степени совпадающее с географической структурой митохондриального генофонда.

Географическая дифференциация такырных круглоголовок и распространение выявленных линий

Проведенные исследования показали глубокую дивергенцию комплекса *helioscopus–persicus*. Большинство из выявленных 12 филогенетических линий комплекса, согласно нашим предварительным данным, имеют алло- или парапатрический характер распространения. На сегодняшний день зоны контактов между выявленными линиями изучены недостаточно. Нельзя исключать возможность симпатрии между линиями D и G в Центральном Узбекистане, менее вероятным представляется наличие контактов между линиями А, С и E на территории Центрального Казахстана.

Две филогруппы (А и С) занимают всю северную и восточную часть ареала. Популяции первой встречаются в Сев. Узбекистане (в Каракалпакии) и в Зап. Казахстане (в Приаралье, на Устюрте и в Сев.-Зап. Кызылкумах). Популяции второй занимают восточную часть Казахстана, включая северную часть Илийской котловины, а также Китайскую и Монгольскую Джунгарию. Южную

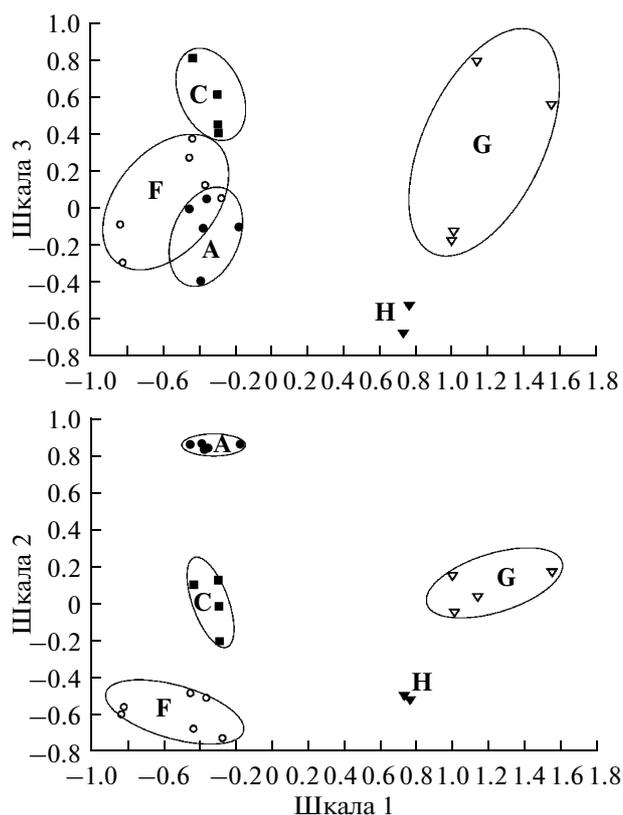


Рис. 4. Многомерное шкалирование генетической изменчивости внутривидовых филогенетических линий *Ph. helioscopus* по данным анализа 332 признаков суммарной матрицы Inter-SINE-PCR (системы праймеров MIR-MIL и OMIR-OMIL) в пространстве трех координат. Значительно отстоящая от *Ph. helioscopus* внешняя группа (*Ph. interscapularis*), а также линии, входящие в состав вида *Ph. persicus*, исключены из анализа. Символы и буквенные обозначения филогенетических линий *Ph. helioscopus* соответствуют приведенным на рис. 1 и 2.

часть и восток северной части Илийской котловины населяют представители филогруппы F. Своеобразны и круглоголовки из окрестностей Сев. Каратау (клада E). Популяции Узбекистана оказались весьма разнообразны и относятся к четырем филогруппам. На севере страны (Каракалпакия) встречается филогруппа А. Популяции *Ph. h. saidalievi* (Ферганская долина) представлены филогруппой H, популяции Сев.-Вост. Узбекистана (Бухарская, Джамбульская и Навоийская обл.) относятся к D, а Юго-Вост. Узбекистана (Сурхандарьинская и юг Бухарской обл.) – к филогруппе G. В то же время образец из окрестностей Небит-Дага в Зап. Туркмении представляет собой самостоятельную линию (B), родственную “северным” филогруппам А–F. Персидские круглоголовки *Ph. p. persicus* включают четыре филогруппы: I – из Закавказья (Армения: Нахичевань и Армавирский марз), J – с Апшеронского п-ова

в Азербайджане, К — из Сев.-Зап. и Сев. Ирана, а также L из Юж. Ирана (окрестности Абадэ).

Предварительная таксономическая структура комплекса *helioscopus—persicus*

Монофилия комплекса *helioscopus—persicus* не вызывает сомнений [7, 35, 36]. Результаты филогенетического анализа как мтДНК- так и яДНК-маркеров подтверждают разделение представителей комплекса на две значительно обособленные группы, соответствующие двум самостоятельным видам: *Ph. helioscopus* и *Ph. persicus*. Высокий уровень разнообразия (на что указывает большое число группировок и высокие генетические дистанции между ними [37, 38]) на юго-западе ареала свидетельствует о том, что первоначальная дифференциация комплекса *Ph. helioscopus—Ph. persicus* началась, вероятно, в районе Иранского плато [39]. Повышенное разнообразие на юго-востоке ареала предполагает наличие второго более позднего центра дифференциации, но уже внутри линии собственно такырных круглоголовков (*Ph. helioscopus*). Вероятно, эволюционная история персидских круглоголовков была более продолжительной, чем у *Ph. helioscopus*, о чем может свидетельствовать более высокая средняя некорректированная внутригрупповая *p*-дистанция для персидских круглоголовков.

Персидские круглоголовки (Ph. persicus)

Изученные популяции Ирана и Закавказья объединяются в монофилетическую группу, в рамках которой можно рассмотреть четыре филогруппы (рис. 2): номинативный подвид (К), круглоголовки из Абадэ (L), из Закавказья, условно относимые к *Ph. h. horvathi* (I), и апшеронская популяция (J).

Круглоголовки из окрестностей Абадэ населяют отроги хребта Кушказар в провинции Фарс и являются самой южной из известных популяций комплекса. Эта аллопатрическая популяция *Ph. persicus* удалена на значительное расстояние от ареала номинативного подвида и отделена горными преградами. Этой изоляции могло оказать достаточно для образования самостоятельной формы, предварительно мы рассматриваем ее как *Ph. persicus* ssp. Согласно нашим данным, закавказские круглоголовки (*Ph. persicus horvathi*) однозначно группируются вместе с персидскими (рис. 3). Таким образом, отнесение их к *Ph. helioscopus* на правах подвида [40] неправомерно. Популяция Апшеронского п-ова (J) образует самостоятельную линию, которая ближе к номинативным (К) персидским и закавказским (I) круглоголовкам, чем к номинативным *Ph. helioscopus*, как предполагалось ранее [41]. Обособленность апшеронских круглоголовков согласуется с пред-

варительным заключением М.Л. Голубева и С.В. Межжерина [42], сделанным на основе аллозимного анализа.

Такырные круглоголовки (Ph. helioscopus)

Популяции, ранее рассматриваемые в составе номинативного подвида *Ph. h. helioscopus*, по данным митохондриальной и ядерной ДНК составляют полифилетическую группу (А, В, D, E, G) (рис. 2).

“Южные” такырные круглоголовки. По результатам анализа мтДНК популяции юга Средней Азии и Турана сформировали следующие обособленные группировки: ферганские круглоголовки *Ph. h. saidalievi* (H), популяции Юж. Узбекистана — Вост. Туркмении (G) и Зап. Туркмении (B). При этом, по данным анализа обоих молекулярных маркеров, популяции из юго-восточной части ареала (филогруппы H из Ферганской долины и G из Сурхандарьинской обл.) образуют монофилетическую группу, заметно обособленную от всех остальных филогрупп *Ph. helioscopus* (“северных” популяций и филогруппы B). Филогруппа из Зап. Туркмении (B) не родственна южноузбекским круглоголовкам (G) и представляет собой самостоятельную линию. Популяции такырной круглоголовки из Сев.-Вост. Ирана предположительно относятся к западно-туркменской филогруппе.

“Северные” такырные круглоголовки. До недавнего времени предполагалось, что северную часть ареала комплекса такырной круглоголовки занимает номинативный подвид *Ph. h. helioscopus*. К *Ph. h. varius* принадлежат популяции с территорий от Балхаша на восток до Монгольской и Китайской Джунгарии, включая Алакольскую, Зайсанскую и (как считалось ранее) Илийскую котловины [9, 43]. Молекулярный анализ показал полифилию этого подвида: популяции Илийской котловины (F) значительно обособлены и неблизкородственны типичным *Ph. h. varius* (C). Типичный *Ph. h. varius*, по-видимому, проникает в долину севернее русла р. Или до цепочки гор Шоллак—Катутау—Алтын-Эмель—Кояндытау. Северобережные популяции восточнее этих гор (окр. гор Актау — популяция № 39, г. Жаркент — № 34) и южнобережные популяции (№№ 33, 35, 37, 38: Сюгатинская долина, Кеген, Ташкарасу) формируют отдельную линию, которую мы предварительно обозначаем как *Ph. h. cameranoi*, используя наименование, предложенное А.М. Никольским [44] для такырных круглоголовков из Кульджи (Иньин, КНР). Сходная картина наблюдается в Илийской котловине и для другой пары близких таксонов круглоголовков: *Ph. guttatus kuschakewitschi* (*Ph. kuschakewitschi*) и *Ph. g. alpherakii* (*Ph. alpherakii*) ([45], рис. 2).

Круглоголовки номинативного (*Ph. h. helioscopus*) подвида (А) мономорфны по всей занимаемой территории. Исключение составляют популяции полуострова (острова) Возрождения (Аральское море) (№ 5) и Мангышлакского Устюрта (№ 10, 15), которые наиболее обособлены. Низкое значение нуклеотидного разнообразия вместе с унимодальной формой распределения частот попарных нуклеотидных различий для популяций филогруппы А (см. табл. 2; рис. 3, в, г) свидетельствуют об относительно недавней экспансии ареала номинативного подвида такырной круглоголовки.

Популяции из северных отрогов гор Каратау (юг Центрального Казахстана, филогруппа Е) образуют самостоятельную линию, генетически обособленную как от восточного подвида *Ph. h. varius* (филогруппа С), так и от западного номинативного подвида (филогруппа А), однако в связи с невысокими значениями бутстрэп-поддержки ее филогенетическое положение пока неопределенно.

Большие значения параметров генетического разнообразия, характерные для популяций “северных” такырных круглоголовок с территории востока и юга Казахстана, а также число выявленных на этой территории митохондриальных линий, говорят, вероятно, об относительно большей древности популяций этой части ареала.

Генетическая дифференциация и таксономический статус выявленных линий

Средние некорректированные *p*-расстояния по фрагменту гена *COI* между такырными круглоголовками и агамовыми ящерицами других родов (*Laudakia*, *Trapelus*) колеблются в пределах от 19.3 до 28.6. При межвидовых сравнениях в пределах рода *Phrynocephalus* минимальные значения *p*-расстояний характерны для близких форм таксономически сложных видовых комплексов. Например, между *Ph. raddei* и *Ph. strauchi* они не превышают 6.5, между *Ph. raddei* и *Ph. reticulatus* достигают 6.6, а между *Ph. strauchi* и *Ph. guttatus* — 8.9 [наши неопубликованные данные]. Средние некорректированные *p*-расстояния между филогруппами комплекса *helioscopus*–*persicus* часто превышают указанные примеры межвидовых расстояний (табл. 3). Таким образом, митохондриальные линии комплекса такырных круглоголовок по уровню дифференциации вполне сопоставимы с самостоятельными видами рода *Phrynocephalus*.

Отдельно следует коснуться вопроса о таксономическом статусе *Ph. h. saidalievi*, эту форму ранее уже рассматривали как отдельный вид [5, 46]. Согласно нашим данным, уровень генетической обособленности ферганской популяции от остальных линий такырных круглоголовок сопоставим с

обособленностью ряда других филогрупп *Ph. helioscopus* (G, E) и ниже, чем для филогрупп *Ph. persicus* (I–L). Кроме того, так как на обеих представленных дендрограммах филогруппа Н является сестринской по отношению к филогруппе G, придание видового статуса ферганской популяции автоматически требует аналогичного действия в отношении филогруппы Юго-Вост. Узбекистана, в связи с чем мы считаем решение о видовом статусе *Ph. h. saidalievi* преждевременным.

Однако одни лишь данные мтДНК сами по себе недостаточны для обоснования видового статуса. Последнее требует привлечения дополнительных ядерных ДНК-маркеров, более полной выборки и морфологического исследования [47]. Короткие диспергированные повторы (SINEs) распределены по всему ядерному геному и являются независимым от мтДНК генетическим маркером. Фингерпринтный анализ по методу Inter-SINE-PCR подтверждает монофилию всех включенных в него митохондриальных группировок (рис. 2, б). Помимо этого, данные Inter-SINE-PCR определенно свидетельствуют в пользу монофилии *Ph. helioscopus* и обособленности этого вида от *Ph. persicus*, значительно превышающей уровень различий между линиями такырных круглоголовок (табл. 4).

В нашем исследовании результаты анализа не только мтДНК-, но и яДНК-маркеров указывают на существование одних и тех же линий. Следовательно, выявленное разнообразие генофонда такырных круглоголовок не может объясняться лишь линейностью наследования мтДНК, а обнаруженные линии представляют собой именно эволюционные группировки, т.е. филогруппы. Хотя филогенетическое положение ряда группировок пока возможно оценить лишь по мтДНК-данным, нам представляется, что, учитывая согласованность выявленных картин географической изменчивости и неперекрывание значений внутри- и межгрупповой вариабельности для обоих типов молекулярных маркеров, мы можем предварительно говорить о том, что выявленные нами митохондриальные линии соответствуют эволюционно обособленным филетическим линиям. Нельзя исключать и самостоятельный таксономический статус хотя бы некоторых из этих филогрупп; для его уточнения необходимы дальнейшие исследования. В связи с этим предварительно мы признаем существование двух политипических видов в составе комплекса такырных круглоголовок — *Ph. persicus* (вид включает *Ph. p. persicus*, *Ph. p. horvathi* и неописанный таксон из Южного Ирана, таксономический статус популяции Апшерона нуждается в уточнении) и *Ph. helioscopus* (включает *Ph. h. helioscopus*, *Ph. h. varius*, *Ph. h. cameranoi*, *Ph. h. saidalievi*, а также ряд неописанных таксонов из Южного Казахстана, Узбекистана и Туркмении). Мы не исключаем, что в свете новых

данных таксономический статус обозначенных нами филогрупп может быть пересмотрен.

Внутривидовая дифференциация такырных круглоголовок и биогеография Средней Азии

Существенный интерес для понимания биогеографии рассматриваемого региона представляет неожиданно большое число значительно обособленных филетических линий, выявленных в составе широкоареального комплекса *helioscopus—persicus*. Многие из них узкоареальны (например, филогруппа L из окрестностей Абадэ в Юж. Иране, филогруппа E из окрестностей Сев. Каратау, популяции Ферганской (H) и Илийской (F) долин). Если границы распространения некоторых филогрупп можно предсказать с достаточной долей уверенности (как для персидских и ферганских круглоголовок), то в ряде случаев они пока не ясны, а для их уточнения необходим сбор дополнительного материала. Во-первых, окончательно не установлена граница между филогруппами Юго-Вост. (G) и Сев.-Вост. Узбекистана (D). Относительно небольшое расстояние между крайними исследованными популяциями и отсутствие явных географических барьеров между ними позволяет предполагать возможность существования контактной зоны между филогруппами G и D. Во-вторых, невыясненной остается граница между *Ph. helioscopus* и *Ph. h. varius*. По мнению некоторых авторов [9], между ними имеется обширная зона интерградации. В связи с недостаточным количеством материала из Центрального Казахстана пока не можем подтвердить или опровергнуть это предположение. В-третьих, исходя всего из двух имеющихся в анализе популяций филогруппы E из Сев. Каратау, пока сложно судить о границах ее распространения.

Древность аридных биоценозов Средней Азии и отдаленность времени возникновения комплекса *helioscopus—persicus* [7, 48, 49] затрудняют поиск факторов, определивших столь глубокую дифференциацию. Единственное выдвинутое на сегодняшний день предположение [7] ссылается на вероятные оледенения в Казахстане в среднем и позднем плейстоцене. Наши молекулярно-генетические данные косвенным образом свидетельствуют о более длительной, чем предполагалось ранее, эволюционной истории видового комплекса *Ph. helioscopus*. Вероятно, одними из определяющих ее дифференциацию факторов были постепенная интенсификация орогенетических процессов и вызванная ими прогрессирующая аридизация на Среднем Востоке и в Средней Азии [50]. Эти факторы могли привести к начальным этапам дифференциации комплекса. На расселение такырных круглоголовок по обширной территории Средней Азии и их внутригрупповую дифференциацию существенное влияние также

могли оказать география русел древних рек и их динамика. Сходную роль эти факторы играли, по-видимому, и в истории расселения и формирования других групп рептилий Средней Азии, в том числе круглоголовок-вертихвосток [39].

Представленный в данной статье филогенетический паттерн в значительной мере совпадает с закономерностями дифференциации других групп рептилий Средней Азии: ящурок (*Eremias*, Lacertidae), гекконов (*Cyrtopodion*, Gekkonidae), а также других видов круглоголовок [39, 49, наши неопубликованные данные]. Данные мтДНК в нашем исследовании получили подтверждение и по маркерам яДНК, что свидетельствует о высоком разнообразии и давней дифференциации изучаемого широкоареального вида ящерицы. Предположительно, сходные филогенетические закономерности могут быть обнаружены и в других группах пресмыкающихся этого региона.

Итак, наше исследование позволило выявить 12 обособленных филогенетических линий в составе комплекса *Ph. helioscopus—Ph. persicus*, большинство из которых подтверждено данными как мтДНК-, так и яДНК-маркеров. Из них четыре относятся к персидской круглоголовке, а остальные восемь — к такырной. На территории Туркменистана, по-видимому, встречаются две различные формы — восточная и западная, а территорию Узбекистана населяют четыре самостоятельные филогруппы. На востоке ареала обособленное положение занимают популяции долины р. Или и окрестностей Сев. Каратау. Дальнейшая разработка филогеографического сценария для комплекса такырных круглоголовок требует более широкого применения ядерных маркеров и проведения молекулярных датировок в сочетании с детальной палеогеографической реконструкцией истории Средней и Центральной Азии в кайнозое.

Авторы благодарны коллегам, принимавшим участие в полевой работе, сборе материала и обсуждении результатов, сборщикам и посредникам в получении материалов, использованных в работе, а также лицам, помогавшим в доступе к коллекциям: И.В. Артюшину, А.Д. Аскендерову, Ф. Ахмадзадэ, М.А. Бакрадзе, А.В. Баранову, О.В. Белялову, Д.А. Бондаренко, М.Г. Буш, Б.Д. Васильеву, А.Б. Васильевой, И.Э. Вашетко, А.А. Веденину, И.А. Винеру, Э.А. Галояну, Е.Н. Гниденко, М.Л. Голубеву, Б.М. Губину, Б. Давасурену, С.И. Долотовской, А.В. Коваленко, В.С. Лебедеву, Д.В. Малахову, А.К. Михальской, Х. Мунхбаяру, Р.А. Назарову, Л.А. Неймарку, А.С. Нуриджанову, В.Ф. Орловой, Е.А. Перегонцеву, Т.Л. Тадевосяну, М.В. Терехову, А.Ф. Ходжаеву, В.А. Хромову, Ю.А. Чикину, М.А. Чириковой, Х. Читсазану и всем сотрудникам Противочумной станции г. Аральска, а также В.В. Гречко и В.С. Лебедеву за плодотворное обсуждение резуль-

татов исследования, В.В. Гречко и С.А. Косушкину за предоставленную возможность работы с Inter-SINE-PCR на базе лаборатории эволюции геномов эукариот ИМБ РАН. Мы признательны А.Б. Борисенко и Н.В. Ивановой и П.Д.Н. Эберу за помощь в получении последовательностей *COI*.

Работа была выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 10-04-00325-а), а также NSERC, Genome Canada, Gordon and Betty Moore Foundation, Canada Foundation for Innovation and Ontario Innovation Trust, Canadian Centre for DNA Barcoding (BIO, ON, Canada).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В.Г. и др. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. Учебное пособие для студентов биол. специальностей пед. ин-тов. М.: Просвещение, 1977. 415 с.
2. Соколовский В.В. Сравнительно-кариологическое изучение ящериц сем. Agamidae. I. Хромосомные наборы восьми видов рода *Phrynocephalus* // Цитология. 1974. Т. 16. № 7. С. 920–925.
3. Манило В.В., Голубев М.Л., Самторов Т. Кариотип *Phrynocephalus helioscopus saidalievi* (Sauria, Agamidae) из Ферганской долины // Вестник зоологии. 1991. № 2. С. 79–81.
4. Manilo V.V., Golubev M.L. Karyotype information on some toad agamas of the *Phrynocephalus guttatus* species group (Sauria, Agamidae) of the former USSR // Asiatic Herpetological Research. 1993. V. 5. P. 105–108.
5. Еремченко В.К., Панфилов А.М. Некоторые методологические вопросы таксономии и филогении круглоголовков на примере *Phrynocephalus helioscopus* (Pallas, 1771) (Sauria: Agamidae) // Наука и новые технологии. 1999. № 3. С. 116–122.
6. Ушаков Б.П. Цитофизиологический анализ внутривидовой дифференциации такырных круглоголовков // Докл. АН СССР. 1962. Т. 144. № 5. С. 1178–1180.
7. Melville J., Hale J., Mantziou G. et al. Historical biogeography, phylogenetic relationships and intraspecific diversity of agamid lizards in the Central Asian deserts of Kazakhstan and Uzbekistan // Mol. Phylogenet. and Evol. 2009. V. 53. P. 99–112.
8. Мельников Д.А. К систематике и филогеографии такырной круглоголовки *Phrynocephalus helioscopus* (Pallas, 1771) // Отчетная научная сессия по итогам работ 2007 г. Тез. докладов. Санкт-Петербург, 2008. С. 32–34.
9. Melnikov D.A., Ananjeva N.B., Rajabizadeh M., Milto K.D. On Systematics and phylogeography of sun watcher toad agamas *Phrynocephalus helioscopus* (Pallas, 1771) // 11th Internat. Symp. on Agamis Lizards “De Agamis”, Programme & Abstracts. Bonn, 2008. P. 21–22.
10. Соловьева Е.Н., Поярко Н.А. Особенности систематики и филогеографии видового комплекса такырных круглоголовков (*Phrynocephalus helioscopus*) (Reptilia: Agamidae) // Тезисы XVI Междун. научной конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2009”. Секция Биология. М., 2009. С. 10–11.
11. Соловьева Е.Н., Поярко Н.А. Анализ распространения видового комплекса такырных круглоголовков *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia, Agamidae) с использованием ГИС-картирования // XVII Междун. научная конф. студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2010”. Секция Биология. М., 2010. С. 142.
12. Solovyeva E.N., Poyarkov N.A., Dunayev E.A. et al. Taxonomy and phylogeography of the sunwatcher toad-headed agama species complex (*Phrynocephalus helioscopus* and *Phrynocephalus persicus*; Reptilia: Agamidae) // SEH 15th OGM, programs and abstracts. Kusadasi – Aydin, 2009. P. 77–78.
13. Solovyeva E.N., Poyarkov N.A., Dunayev E.A., Bannikova A.A. Phylogeny of the sunwatcher agama species complex, *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia, Agamidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers // Contributions to the 2nd Moscow Intern. conf. “Molecular Phylogenetics” (MolPhy– 2). Moscow, 2010. P. 71.
14. Solovyeva E.N. Molecular differentiation and distribution within the species complex of *Phrynocephalus helioscopus* (Reptilia: Agamidae) // 2nd Int. symp. on Agamid lizards, De Agamis 2. Abstracts. St.-Petersburg, 2010. P. 26–27.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 2100 p.
16. Ivanova N.V., deWaard J., Hebert P.D.N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA // Mol. Ecology Notes. 2006. V. 6. P. 998–1002.
17. Банникова А.А., Булатова Н.Ш., Крамеров Д.А. Генетическая изменчивость обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* L. европейской России и Сибири по данным о полиморфизме длин участков ДНК, фланкируемых короткими диспергируемыми повторами (Inter-SINE-PCR), и взаимоотношение хромосомных рас “Москва” и “Селигер” // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 735–747.
18. Jurka J., Zietkiewicz E., Labuda D. Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. № 1. P. 170–175.
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids Symp. 1999. Ser. 41. P. 95–98.
20. Swofford D.L. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland MA [software]: Sinauer Associates, 1998.
21. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. P. 1596–1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

22. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 5269–5273.
23. STATSOFT, Inc. STATISTICA for Windows. StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street. Tulsa, OK, 1995. P. 74104–74442.
24. Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data // Genetics. 1992. V. 131. P. 479–491.
25. Excoffier L., Lischer H. Arlequin ver. 3.5.1.2. An integrated software package for population genetics data analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35>
26. Tajima F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations // Genetics. 1983. V. 105. P. 437–460.
27. Rogers A.R., Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9. P. 552–569.
28. Aris-Brosou S., Excoffier L. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism // Mol. Biol. Evol. 1996. V. 13. P. 494–504.
29. Ray N., Currat M., Excoffier L. Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 76–86.
30. Рябинина Н.Л., Банникова А.А., Шереметьева В.А. и др. Анализ ДНК высших приматов с помощью интер-SINE-ПЦР // Генетика. 2008. Т. 44. № 3. С. 315–322.
31. Ryabinina N.L., Bannikova A.A., Kosuchkin S. Estimation of the subspecific level of differentiation in Caucasian lizards of the genus *Darevskia* (syn. “*Lacerta saxicola* complex”). Lacertidae, Sauria) using genome DNA markers // Russ. J. Herpetology. 2002. V. 9. № 3. P. 185–194.
32. Гречко В.В., Банникова А.А., Косушкин С.А. и др. Молекулярно-генетическое разнообразие комплекса ящериц *Darevskia raddei* (Lacertidae: Sauria): ранние этапы видообразования // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 5. С. 839–851.
33. Buntjer J.B. DNA Repeats in Vertebrate Genome as Probes in Phylogeny and Species Identification. Utrecht. Univ. Press, 1997. P. 25–38.
34. Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А. Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих // Генетика. 2002. Т. 38. № 6. С. 853–864.
35. Pang J., Wang Y., Zhong Y. et al. A phylogeny of Chinese species in the genus *Phrynocephalus* (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2003. V. 27. P. 398–409.
36. Dunayev E. A., Ivanova N. V., Poyarkov N. A. et al. Molecular perspective on the evolution and barcoding of toad-headed agamas (genus *Phrynocephalus*; Agamidae) in Middle Asia // 14th Europ. Congr. of Herpetology and SEH Ordinary General Meeting. Abstracts, 2007. P. 208.
37. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics // Annu. Rev. Ecol. Syst. 1987. V. 18. P. 489–522.
38. Avise J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press, 2000, viii + 447 p.
39. Ananjeva N.B., Tuniev B.S. Historical biogeography of the *Phrynocephalus* species of the USSR // Asiatic Herpetological Res. 1992. V. 4. P. 76–98.
40. Мельников Д.А., Ананьева Н.Б., Агасян А.Л., Раджабизаде М. История изучения и таксономический статус персидской круглоголовки *Phrynocephalus persicus* de Filippi, 1863 и такырной круглоголовки Хорвата *Phrynocephalus helioscopus horvathi* Mehely, 1894 // Третий съезд герпетологического общества им. А.М. Никольского. Вопросы герпетологии. Санкт-Петербург, 2008. С. 286–297.
41. Даревский И.С. Туранские элементы в герпетофауне Закавказья и вероятные пути проникновения из Средней Азии // Изв. АН Армянской ССР. 1957. Вып. X. № 12. С. 69–77.
42. Голубев М.Л., Межжерин С.В. О видовой принадлежности и происхождении апшеронской популяции персидской круглоголовки *Phrynocephalus persicus* (Reptilia, Agamidae) // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 1999. Т. 104. Вып. 1. С. 59–61.
43. Barabanov A.V., Ananjeva N.A. Catalogue of the available scientific species-group names for lizards of the genus *Phrynocephalus* Kaup, 1825 (Reptilia, Sauria, Agamidae) // Zootaxa. 2007. V. 1399. P. 1–56.
44. Никольский А.М. Пресмыкающиеся (Reptilia). Chelonina and Sauria. Фауна России и сопредельных стран. Петроград, 1915. Т. 1. 532 с.
45. Дунаев Е.А. Систематика и палеогеография: концептуальный синтез на примере *Phrynocephalus* (superspecies *guttatus*) (Reptilia: Agamidae) // Сб. трудов Зоолог. музея МГУ. 2009. Т. 50. С. 275–298.
46. Sindaco R., Jeremcenko V.K. The Reptiles of the Western Palearctic. Latina: Edizioni Belvedere, 2008. 579 p.
47. Fu J.-z., Zeng X.-m. How many species are in the genus *Batrachuperus*? A phylogeographical analysis of the stream salamanders (family Hynobiidae) from southwestern China // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 1469–1488.
48. Guo X., Wang Y. Partitioned Bayesian analyses, dispersal-vicariance analysis, and the biogeography of Chinese toad-headed lizards (Agamidae: *Phrynocephalus*): A re-evaluation // Mol. Phylogenet. Evol. 2007. V. 45(2). P. 643–662.
49. Macey J.R., Schulte J.A. II, Larson A. et al. Evaluating Trans-Tethys migration: an example using acrodont lizard phylogenetics // Syst. Biol. 2000. V. 49. № 2. P. 233–256.
50. An Zh.-sh., Kutzbach J.E., Prell W.L., Porter S.C. Evolution of Asian monsoons and phased uplift of the Himalaya – Tibetan plateau since Late Miocene times // Nature. 2001. V. 411. P. 62–66.

**Molecular Differentiation and Taxonomy of the Sunwatcher Toadheaded Agama
Species Complex *Phrynocephalus* superspecies *helioscopus*
(Pallas, 1771) (Reptilia: Agamidae)**

E. N. Solovyeva^a, N. A. Poyarkov^a, E. A. Dunaev^b, T. N. Duysebayeva^c, and A. A. Bannikova^a

^a*Department of Vertebrate Zoology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*
e-mail: anolis@yandex.ru

^b*Zoological Museum, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 125009 Russia*

^c*Institute of Zoology, Almaty, 480060 Kazakhstan*

Lizards of the sunwatcher toad-headed agama species complex *Phrynocephalus* superspecies *helioscopus*, mostly distributed in Middle Asia and Middle East, were examined using analysis of variation at the mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I gene fragment and fingerprint analysis of nuclear DNA (inter-SINE PCR technique). A total of 86 individual tissue samples from 53 populations, to the full extent representing different parts of the species complex range, were subjected to molecular genetic examination, and surprisingly deep differentiation was revealed. The populations analyzed split into 12 isolated phylogroups, many of which were characterized by a narrow range and genetic isolation. Monophyly of sunwatcher (*Ph. helioscopus*) and Persian (*Ph. persicus*) toad-headed agamas was confirmed. However, both of these species probably represent the species complexes. Zoogeography of Middle Asia is discussed.