

На правах рукописи

Блохин Иван Геннадьевич

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ НА ПРИМЕРЕ ВОСТОЧНОЙ
ПРЫТКОЙ ЯЩЕРИЦЫ *LACERTA AGILIS EXIGUA***

Специальность: 03.02.14 – Биологические ресурсы

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре зоологии ФГБОУ ВПО «Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Глазко Валерий Иванович,**
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВО
«Российский государственный аграрный
университет - МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Рахимов Ильгизар Ильясович,**
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой биоэкологии, гигиены и
общественного здоровья ФГАОУ ВО «Казанский
(Приволжский) федеральный университет»

Боронникова Светлана Витальевна,
доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой ботаники и генетики
растений ФГАОУ ВО «Пермский государственный
национальный исследовательский университет»

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы
народов»

Защита диссертации состоится 26 мая 2022 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.043.12, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, 19, тел./факс: (495) 976-21-84.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета: www.timacad.ru

Автореферат разослан « » 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 220.043.12
кандидат биологических наук, доцент

А.А. Кидов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последнее время из-за увеличения антропогенного воздействия происходят изменения и сокращение естественных ареалов многих видов животных, а вызванное человеком уменьшение биоразнообразия растёт и затрагивает всю планету (Barnosky et al., 2011; Ceballos et al., 2020; Almond et al., 2020; Wake, Vredenburg, 2008). По различным оценкам современные темпы вымирания видов на два-три порядка выше, чем "фоновые" (Ceballos et al., 2015). Ограниченные ресурсы охраны природы делают первостепенной задачей определение ключевых областей биоразнообразия и потенциальных угроз для них, что особенно важно для ресурсных и редких видов животных (Brum et al., 2017; Pollock et al., 2017; Roll et al., 2017; Kier et al., 2009; Orme et al., 2005; Kunin, Gaston, 2012). В связи с этим изучение характеристик такого широко распространенного вида как прыткая ящерица, позволяющих объективно отражать и прогнозировать состояние её популяций, представляется актуальным.

В связи с высокой численностью и плотностью популяций, прыткая ящерица является популярным объектом различных исследований (Roitberg et al., 2015; Ljungström et al., 2015). Прыткая ящерица занимает существенное место в трофических цепях как хищник и объект питания рептилий, птиц и млекопитающих (Казьмин и др., 2018; Вилкина и др., 2000; Пекло, Очаповский, 2013), а также как промежуточный и постоянный хозяин многих видов паразитов (Шарпило, 1976; Шималов, 2010), поддерживающий природные очаги трансмиссивных заболеваний (Bauwens et al., 1983; Majlathova et al., 2008). Таким образом, прыткая ящерица является важным узлом трофических цепей, взаимоотношений «паразит – хозяин», а также одним из видов, формирующих биоразнообразие занимаемых биотопов.

Структуру и состояние популяций животных описывают с помощью фенотипических характеристик, однако их оценка из-за высокого уровня вариабельности приводит к противоречивым данным. В этой связи более надёжным методом контроля состояния популяции и её динамики может быть комплексный анализ фенотипических и молекулярно-генетических признаков (Kozak et al., 2011). Ещё одной характеристикой, отражающей состояние популяции, может быть соотношение полов и половая дифференциация, изменчивость которых в зависимости от факторов среды широко известна (Геодакян, 2000; Артамонова и др., 2021).

Традиционным методом оценки состояния популяций прыткой ящерицы является анализ морфометрических параметров, характеристик щиткования и

окраски. Несмотря на большое количество соответствующих исследований (Прыткая ящерица, 1976; Сухов, 1948; Терентьев, Чернов, 1949; Калябина-Хауф, Ананьева, 2004; Корнейчук, Чирикова, 2005; Песков и др., 2010; Малюк, 2014; Erplanova, Roitberg, 2015; Больных, Жигилева, 2015; Кукушкин и др., 2020), многие аспекты фенотипической изменчивости, например, выраженность половых отличий, остаются дискуссионными.

В качестве дополнительного показателя состояния популяции могут быть использованы характеристики геномной нестабильности, которая у самцов ряда видов животных выше, чем у самок (Olsson et al., 2010; Дробот, Ремизова, 2012; Симонян и др., 2015; Rebecca L. Watson et al, 2017; Kathleen et al., 2018; Nicky Rollings et al, 2019). Повышенная смертность новорожденных самцов по сравнению с самками является крайним следствием влияния неблагоприятных факторов среды, в то же время некоторые другие геномные характеристики, такие как высокополиморфные геномные элементы (микросателлиты и ретротранспозоны), могут объективно отражать действие факторов меньшей интенсивности.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение фенотипической и молекулярно - генетической изменчивости восточной прыткой ящерицы *Lacerta agilis exigua*, как модельного вида, для оценки состояния ее популяций в разных локалитетах.

Исходя из поставленной цели, нами решались следующие задачи:

- 1) оценить встречаемость прыткой ящерицы в рационе птиц;
- 2) оценить фенотипическое разнообразие ящериц различных локалитетов;
- 3) для оценки молекулярно-генетической изменчивости провести сравнительный анализ полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов и длинными концевыми повторами эндогенных ретровирусов, оценить зависимость полиморфизма ДНК-маркеров от локализации в геноме;
- 4) выбрать из полученных данных по ДНК маркерам наиболее информативные для выявления межпопуляционных, межполовых и индивидуальных отличий у исследованных групп ящериц;
- 5) для оценки состояния популяции сравнить выраженность полового диморфизма ящериц по фенотипическим признакам и генетическим дистанциям по ДНК маркерам в зависимости от условий локалитета.

Научная новизна. Обнаружены половые отличия по популяционно-генетической дифференциации восточной прыткой ящерицы в различных

локалитетах, описано присутствие участков гомологии в геноме восточной прыткой ящерицы к длинным концевым повторам эндогенных ретровирусов Sabrina и SIRE-1. Обнаружено, что характеристикой состояния популяции может быть не только численное соотношение самок и самцов, но и индивидуальное разнообразие самцов по сравнению с самками по различным характеристикам. Впервые выявлены высоко полиморфные ДНК маркеры, позволяющие получать наиболее информативные по количеству локусов и полиморфизму спектры, необходимые для описания генетических структур и их динамики у восточной прыткой ящерицы с высоким разрешением, а также совпадающие внутри- и межпопуляционные отличия по отдельным фенотипическим признакам и спектрам ДНК-маркёров.

Практическая значимость. На примере прыткой ящерицы показано, при использовании комплексного анализ полиморфизма разных геномных элементов и фенотипических характеристик, что каждый из них вносит свой индивидуальный вклад в формирование популяционно - генетических отличий восточной прыткой ящерицы по полу и локалитету, что позволяет предлагать такой комплексный анализ как наиболее информативный метод для оценки состояния популяций и контроля динамики популяционной структуры.

Методология. Основой идеи диссертации послужили исследования, посвящённые поиску наиболее информативных характеристик, способных отражать состояние популяции животных в зависимости от различных факторов среды (Gullberg et al., 1997; Ciobanu et al., 2004; Гречко и др., 2006; 2001; 2005; 2011; Ljungström et al., 2015) с целью контроля и прогнозирования его дальнейшей динамики.

Положения, выносимые на защиту.

1. Морфометрические характеристики и показатели фолидоза у прыткой ящерицы по-разному отвечают на действие факторов окружающей среды, что может объяснять противоречивость оценок при изучении состояния популяций.
2. При применении ДНК маркеров наиболее информативными по количеству выявляемых генотипов и их полиморфизму оказываются связанные с ретротранспозонами по сравнению с микросателлитами.
3. Каждая фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика вносит свой вклад в дифференциацию животных в зависимости от пола и занимаемого локалитета.
4. Выраженность полового диморфизма по ряду фенотипических и молекулярно-генетических характеристик в популяциях меняется в зависимости от условий среды обитания.

5. Предварительный анализ референтных геномов по распределению генотипируемых участков локализации микросателлитов и фрагментов ретротранспозонов и выяснение их ассоциаций с частотой встречаемости такой вторичной структуры ДНК, как G4 квадруплексы, может способствовать увеличению эффективности их применения в популяционно-генетических исследованиях.

Степень достоверности и апробация работы. Полученный цифровой материал обработан биометрически по стандартным методикам. Основные положения диссертации были доложены на следующий конференциях:

1. Международная научная конференция «Ломоносов – 2019» (МГУ 12-23 апреля 2019 г.);

2. Международная студенческая научно-практическая конференция, посвященная 145-летию со дня рождения А.Г. Дояренко (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева 26-29 марта 2019 г.);

3. Всероссийская (национальная) научно-практическая конференция «Актуальные проблемы молодежной науки в развитии АПК» (Курская ГСХА, 11-13 декабря 2019 г.);

4. Международная научно-практическая конференция «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (РГАУ- МСХА имени К.А. Тимирязева, 2019 г.);

5. XVIII Международный конкурс научных работ PTScience 16.07.2020;

6. Международная научная конференция «Ломоносов – 2021» (МГУ 12-23 апреля 2021 г.);

7. IV Международная научная конференция по доместикации «Доместикация как основа аграрной цивилизации», посвященная памяти академика Дмитрия Константиновича Беляева (НИИПЗК, 2-4 июня 2021 г.);

8. Международная научно-практическая конференция «Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России» (РГАУ- МСХА имени К.А. Тимирязева, 2022 г.).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведены все этапы научного исследования, включая планирование, подготовку и проведение экспериментов, анализ полученных результатов.

Публикация результатов исследования. Основные результаты работы опубликованы в 10 научных статьях, в том числе 3 из них в журналах, рекомендованных ВАК России, и 2, входящих в базу данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 160 страницах

компьютерного текста и включает введение, основную часть, содержащую 36 таблиц и 52 рисунка, заключения, списка литературы (193 наименований, в том числе 98 на иностранных языках) и 8 страниц приложения.

Благодарности. Автор выражает благодарность коллективу кафедры зоологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, сотрудникам сектора герпетологии зоологического музея МГУ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа была выполнена в 2018-2022 гг. на кафедре зоологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Исследования проводили в четырёх локалитетах (рис. 1), где производился отлов ящериц. Помимо отловленных животных в исследовании использовали ящериц коллекции отдела герпетологии зоологического музея МГУ (всего 268 особей).

В зависимости от занимаемой природной зоны и расположения 20 точек сбора, ящерицы были поделены на четыре локалитета: локалитет 1 с преобладанием лесостепной зоны, локалитет 2, 3, 4 – степь. Локалитет 1 – наиболее северный, 2 – северо-восточный, локалитет 3 – южный, локалитет 4 – юго-западный, (рис. 1).



Рисунок 1. – Точки сбора прытких ящериц, объединённые в локалитеты 1, 2, 3, 4

У всех особей выполнен анализ морфометрических признаков (12 характеристик), 11 индексов (относительные признаки на основе морфометрических показателей) и показателей щиткования (22 признака) по стандартным методикам (Даревский и др., 1976; Кукушкин и др., 2020; Малюк, Песков, 2011), суммарно 12 060 промеров. Результаты оценивали с использованием теста Тьюки и критерия Стьюдента на наличие статистически достоверных различий при помощи приложения Excel, комплексное сравнение выборок при помощи дискриминантного канонического анализа производили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0 (www.statsoft.ru).

У отловленных ящериц хутора Верхнекардаильского (локалитет 1) и хутора Среднего (локалитет 3) прижизненно купировали хвосты, мышцы которых и служили источником геномной ДНК. Животных в последующем выпускали в изначальные места, где они были отловлены. Выполнен анализ полиморфизма 70 локусов и 3850 генотипов.

Геномную ДНК выделяли из биообразцов мышц хвоста стандартным набором ДНК Экстран II («Синтол»). Полимеразная цепная реакция (PCR) проводилась на амплификаторе «Терцик» со следующими параметрами: первичная денатурация ($t=94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 мин), денатурация ($t=94\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 сек), отжиг ($t=58\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 сек), элонгация ($t=72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 мин) – 40 циклов, финальная элонгация ($t=72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 мин).

В качестве маркеров оценивали полиморфизм фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (Inter Simple Sequence Repeat - ISSR-PCR), а также участками длинных концевых повторов эндогенных ретровирусов (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism - IRAP-PCR).

В качестве праймеров в PCR использовали тринуклеотидные микросателлиты $(\text{ACC})_6\text{T}$, $(\text{TGC})_6\text{C}$, $(\text{GAG})_6\text{C}$ и участки длинных концевых повторов эндогенных ретровирусов LTR-SIRE1 (5' – GCAGTTATGCAAGTGGGATCAGCA – 3') и Sabrina 111 (5' – AAACAAGAACTGACACTTGGCACT- 3'). Элементы семейства эндогенного ретровируса Sabrina впервые описаны у ячменя (Shirasu et al., 2000), LTR-SIRE 1 - у сои (Glazko et al., 2015).

Статистическая обработка полученных данных проводилась по стандартной методике (Плохинский, 1961). Расчёт генетических дистанций выполняли с помощью программы GenAlEX, построение дендрограмм - с помощью программы TFPGA. Дендрограммы строились с использованием не менее 1000 итераций с выводением в конечный результат наиболее часто воспроизводимого

результата.

Поиск участков гомологии с идентичностью не менее 90% к используемым праймерам в референтном геноме прыткой ящерицы производился с помощью алгоритмов NCBI BLAST+ Standalone, языка программирования Python и библиотеки Biopython. Из найденных участков, соответствующих по длине наиболее часто встречающимся генотипам в экспериментальных исследованиях, выбирался один, в котором производился поиск мобильных генетических элементов, G4 квадруплексов и микроРНК с помощью программ CENSOR и QGRS Search Options.

Питание птиц фиксировалось во время полевых наблюдений в указанных локалитетах, а также по составу погадок и желудков.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Прыткая ящерица в рационе птиц Ставропольского края

Для изучения роли прыткой ящерицы в питании разных видов птиц нами проводились исследования в различных районах Ставропольского края (рис. 2).

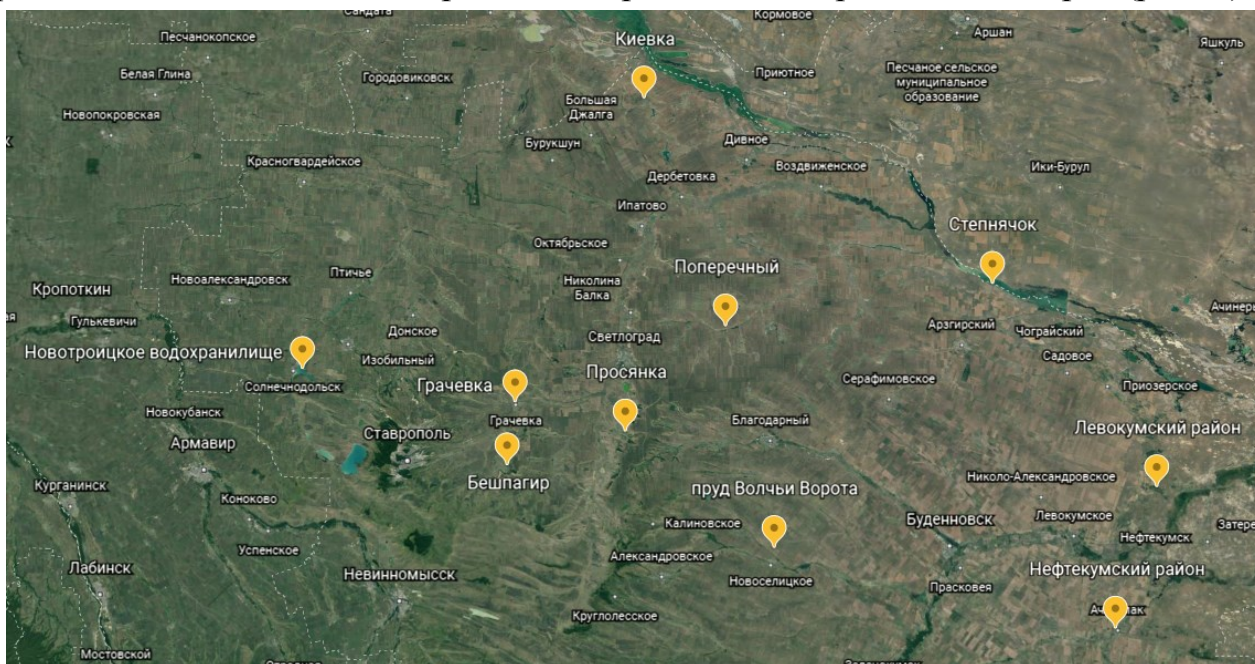


Рисунок 2. – Места исследования питания птиц

По результатам наших исследований, прыткая ящерица присутствует в рационе 14 видов птиц, принадлежащих к 8 семействам. Самая частая встречаемость ящериц в желудках и погадках птиц наблюдается у сизоворонки, степной пустельги и большой белой цапли. Следует отметить, что в 3 желудках северокавказского фазана, являющегося преимущественно растительноядным видом, нами были зафиксированы остатки прыткой ящерицы, являющейся нехарактерной пищей для данного вида (табл. 1 – 2).

Таблица 1. – Встречаемость прыткой ящерицы в погадках птиц

Локалитет	Вид	Кол-во погадок, шт.	Кол-во погадок с прыткой ящерицей	% встречаемости
Туркменский район	Серая цапля (<i>Ardea cinerea</i>)	28	3	11
Нефтекумский район	Степная пустельга (<i>Falco naumanni</i>)	18	11	61
Изобильненский район, Новотроицкое водохранилище	Большая белая цапля (<i>Ardea alba</i>)	9	4	44
Пруд Волчьих ворота	Обыкновенная кваква (<i>Nycticorax nycticorax</i>)	58	6	10
Всего		113	24	21,2

Таблица 2. – Встречаемость прыткой ящерицы в желудках птиц

Вид	Кол-во желудков, шт.	Кол-во желудков с прыткой ящерицей	% встречаемости
Фазан северокавказский (<i>Phasianus colchicus</i>)	92	3	3,3
Сизоворонка (<i>Coracias garrulus</i>)	5	5	100

Наибольшее число случаев питания птиц ящерицами были зафиксированы нами в мае, когда высока активность ящериц, затем количество случаев уменьшается, доходя до минимума в августе, что можно объяснить снижением встречаемости ящериц к этому времени (Епланова, 2008; Песков и др., 2003; Щепотьев, 1948) (табл. 3).

Таблица 3. – Случаи поедания птицами ящериц

Локалитет	Вид	Время встречи	Кол-во случаев
Петровский район, с. Просянка	Серый сорокопут (<i>Lanius excubitor</i>)	октябрь	2
Туркменский район, хутор Поперечный	Серая цапля (<i>Ardea cinerea</i>)	май	8

Локалитет	Вид	Время встречи	Кол-во случаев
Апанасенковский район, село Киевка	Сирийский дятел (<i>Dendrocopos syriacus</i>)	август	1
Грачёвский район, село Грачёвка	Ворон (<i>Corvus corax</i>)	май	2
Терско-Кумский канал, посёлок Теркум	Грач (<i>Corvus frugilegus</i>)	сентябрь	2
Арзгирский район, лагерь Степнячок	Сорока (<i>Pica pica</i>)	июль	2
Балка Бешпагир	Луговой лунь (<i>Circus pygargus</i>)	июнь	3

По литературным данным притких ящериц поедают такие виды птиц как серая цапля (*Ardea cinerea*) (Винокуров, 1960), рыжая цапля (*Ardea purpurea*) (Винокуров, 1960), обыкновенная пустельга (*Falco tinnunculus*), кобчик (*Falco vespertinus*), степной лунь (*Circus macrourus*), луговой лунь (*Circus pygargus*), болотный лунь (*Circus aeruginosus*) (Олейников, 1966), чёрный коршун (*Milvus migrans*) (Ильях, 2017; Волчанецкий, 1959), подорлик (*Aquila clanga*) (Соколов и др., 2019), орлан – белохвост (*Haliaeetus albicilla*) (Соколов и др., 2019), обыкновенный сарыч (*Buteo buteo menetriesi*) (Жарков, 1938), филин (*Bubo bubo*) (Ильях, 2017), змееяд (*Circaetus gallicus*), удод (*Upupa epops*), жулан (*Lanius collurio*), скворец (*Sturnus vulgaris*), певчий дрозд (*Turdus philomelos*) (Очаповский 1969), чайка-хохотунья (*Larus argentatus cachinnans*) (Киселёв, 2009), при этом доля приткой ящерицы в рационе различных видов птиц может достигать 27% (Пекло, Очаповский, 2013). Нами получены похожие данные, позволяющие подтвердить значимость приткой ящерицы в рационе некоторых видов птиц.

Фенотипическая изменчивость и половой диморфизм

Морфометрия

Фенотипические характеристики приткой ящерицы обладают высоким уровнем изменчивости, которая у некоторых из показателей ассоциирована с эколого-географическими особенностями локалитетов отлова. Так, в частности, известно, что ящерицы становятся крупнее при продвижении на юг ареала («Приткая ящерица», 1976). В этой связи можно было ожидать, что между ящерицами локалитетов 1 и 2 будет обнаружено меньше статистически значимых отличий, чем при сравнении ящериц этих двух локалитетов с ящерицами

локалитета 3 и 4, причем последние будут превосходить ящериц первых двух локалитетов по морфометрическим признакам.

В целях проверки этих предположений выполнен сравнительный анализ ящериц четырёх локалитетов.

По морфометрическим показателям больше всего отличий было выявлено между наиболее удалёнными друг от друга локалитетов 1 и 3. Ящерицы самого южного – третьего локалитета, превзошли по всем признакам ящериц локалитета 1. Ящерицы локалитетов 1 и 2 отличались друг от друга шириной анального щитка, ступни и голени, По этим признакам ящерицы локалитета 2 превзошли ящериц локалитета 1.

При сравнении самцов ящериц четырёх локалитетов нами были обнаружены статистически значимые отличия по 4 фенотипическим характеристикам (3 абсолютных морфометрических признака и 1 – фоллидоза). Наибольшее количество отличий выявлено между самцами ящериц при сравнении локалитета 4 со всеми остальными.

Исходя из значений расстояний Махаланобиса, можно заключить, что по морфометрическим признакам дистанции между самцами четырёх локалитетов превышают дистанции между самками, что свидетельствует об относительно большей неоднородности самцов по этим характеристикам (табл. 4).

Таблица 4. – Расстояния Махаланобиса между ящерицами трёх локалитетов по морфометрическим признакам

Самцы				Самки			
	Лок 2	Лок 3	Лок 4		Лок 2	Лок 3	Лок 4
Лок ¹ 1	1,69	5,22**	27,90**	Лок 1	1,16	2,62**	8,12**
Лок 2		4,07*	30,23**	Лок 2		2,24*	8,09**
Лок 3			30,19**	Лок 3			6,97**

¹ Лок – Локалитет

Здесь и далее: **- $P \leq 0,01$; *- $P \leq 0,05$.

Дистанции Махаланобиса между самками и самцами оказались наибольшими у ящериц локалитета 3 (6,61), наименьшими – у ящериц локалитета 1 (3,52). Наибольшее количество статистически значимых отличий по морфометрическим признакам наблюдалось между самками и самцами ящериц локалитета 1, а наименьшее – между ящерицами локалитета 2.

Фоллидоз

Статистически значимые отличия по показателям щиткования обнаружены, в основном, при сравнении ящериц самого западного локалитета 4 со всеми

остальными, что может отражать отличия в ответах разных фенотипических характеристик на влияния одного и того же фактора среды.

Полученные нами данные совпадают с результатами исследований других авторов (Песков, Бровко, 2005; Ручин, Рыжов, 2006; Симонов, 2007), в которых также наблюдается клинальная изменчивость этих признаков у исследуемого вида с запада на восток.

Расстояния Махаланобиса между группами самцов в разных локалитетах (1, 2, 3) превысили значения дистанций между самками, как и в случае морфометрических признаков. Исключение составляют дистанции между ящерицами локалитетов 1 и 3, расстояния Махаланобиса между самками оказались больше, чем между самцами (табл. 5).

Таблица 5. – Расстояния Махаланобиса между ящерицами трёх локалитетов по параметрам щиткования

Самцы			Самки		
Лок 2	Лок 3		Лок 2	Лок 3	
8,11*	2,76**	Лок 1	4,39*	3,65**	Лок 1
	8,55*	Лок 2		5,07*	Лок 2

Наибольшие значения расстояний Махаланобиса по признакам щиткования между группами самок и самцов ящериц выявлено в локалитете 2 (7,52). Дистанции между самками и самцами локалитетов 1 и 3 составили, соответственно, 3,57 и 4,65 (различия статистически значимы, $P \leq 0,05$).

В целом, при оценке межпопуляционной изменчивости фенотипических характеристик, можно заключить, что наибольшее количество статистически значимых отличий обнаружены при сравнении ящериц локалитета 1 и локалитета 3. Ящерицы самого южного – 3-го локалитета, превзошли ящериц локалитета 1 по абсолютным и относительным морфометрическим характеристикам, что соответствует тенденции увеличения размеров и массы тела ящериц в южных местообитаниях в отличие от более северных. Между ящерицами близких друг к другу локалитетов 1 и 2 выявлено значительно меньше статистически значимых отличий по морфометрическим признакам, в то же время, в дифференциацию ящериц данных локалитетов вовлекаются параметры щиткования.

При сравнении групп самок и самцов четырёх локалитетов наибольшее количество отличий было выявлено между самками (7 отличий по промерам, 1 – по индексу, 4 – по фоллидозу), в дифференциацию самок локалитета 1 и 3 вовлекались в основном морфометрические признаки, а между самками ящериц

локалитета 1, 2, 4 – признаки фолидоза. Такие же результаты были получены при сравнении самцов ящериц, но менее выраженные (3 промера и 1 индекс).

По результатам дискриминантного анализа и на основании представленных графиков можно утверждать, что у ящериц локалитета 2 наименее выражен половой диморфизм по морфометрическим параметрам, наиболее – по признакам фолидоза.

Судя по расстояниям Махаланобиса, наибольшие дистанции по морфометрическим признакам между группами самок и самцов ящериц наблюдаются в юго-западном локалитете 4 (7,83), а наименьшие – между ящерицами северного локалитета 1 (3,52). Такие данные могут объясняться уже упомянутой тенденцией увеличения массы и длины тела ящериц южных локалитетов по сравнению с северными, из-за чего отличия между самцами и самками по морфометрическим признакам могут также увеличиваться.

При сравнении групп самцов и самок ящериц расстояния Махаланобиса во всех случаях были больше между самцами четырёх локалитетов, чем между самками, то есть самцы отличались большим межпопуляционным разнообразием, чем самки.

Для оценки внутрипопуляционного разнообразия выполнен анализ индивидуальной фенотипической изменчивости ящериц в каждом локалитете.

Наиболее выраженная индивидуальная дифференциация между самцами ящериц наблюдается в локалитетах 1 и 4.

Половой диморфизм по морфометрическим параметрам наиболее выражен у ящериц локалитета 1, между самками и самцами ящериц данного локалитета оказалось 16 отличий. Между самками и самцами ящериц локалитета 2 их оказалось 4, локалитета 3 – 11, локалитета 4 – 8. По литературным данным, половой диморфизм у различных животных становится более выраженным в неблагоприятных условиях, где требуется относительно повышенная эволюционная пластичность популяции (Геодакян, 1987; Булахова, 2004). Исходя из этого, можно заключить, что локалитет 1 является самым неблагоприятным для обитания ящериц, а локалитет 2 – наиболее благополучным.

Следует отметить, что только между самками и самцами ящериц локалитетов 2 и 4 обнаружены статистически значимые отличия по признакам фолидоза, которые не вовлекались в дифференциацию ящериц остальных локалитетов. Известно, что увеличение разнообразия чешуйчатого покрова в степных популяциях ящериц по ряду признаков ассоциировано с климатическими факторами, эффект от которых формируется во время инкубации яиц и развития эмбрионов (Хонякина, Ферхатова, 1977; Захаров, 1981; Ройтберг, 1981, 1989).

Помимо этого, утрата полимерности чешуйчатого покрова может быть ассоциирована с относительным неблагополучием занимаемого ящерицами локалитета.

Индивидуальные расстояния Махаланобиса между самцами в каждом локалитете превысили расстояния между самками тех же точек сбора, что свидетельствует о большем разнообразии самцов. Количество статистически значимых отличий между самцами и самками по фенотипическим характеристикам варьировало в зависимости от особенностей изучаемого локалитета, что может отражать разную интенсивности воздействия факторов среды на отдельные фенотипические характеристики (табл. 6).

Таблица 6. – Количество статистически значимых отличий между ящерицами по фенотипическим признакам

Локалитет	Количество статистически значимых отличий по фенотипическим характеристикам	
	Самцы	Самки
Локалитет 1	8 промеров, 4 индекса, 7 признаков фolidоза	1 промер, 6 индексов, 5 признаков фolidоза
Всего	19	12
Локалитет 3	1 промер, 3 индекса	3 промера, 3 индекса, 3 признака фolidоза
Всего	4	9
Локалитет 4	1 промер	0
Всего	1	0

В общем, полученные нами данные свидетельствуют о специфических особенностях ответа фенотипических признаков на действие разных факторов окружающей среды на животных, в частности, на популяции прыткой ящерицы.

Молекулярно-генетическая изменчивость.

Суммарно с использованием ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров у прытких ящериц оценен полиморфизм 70 фрагментов геномной ДНК (локусов). В результате получены данные, представленные в табл. 7.

Таблица 7. – Сравнительные показатели PIC (полиморфный информационный контент) и ДПЛ (доли полиморфных локусов) у исследованных групп животных по ISSR-PCR и IRAP-PCR маркерам

Праймер	PIC	Количество фрагментов ДНК			ДПЛ (%)
		Всего	Консервативные	Полиморфные	
Sabrina	0,30±0,05	19	0	19	100
LTR-SIRE1	0,34±0,05	16	0	16	100

Праймер	PIC	Количество фрагментов ДНК			ДПЛ (%)
		Всего	Консервативные	Полиморфные	
(ACC) ₆ T	0,28±0,04	16	5	11	69
(TGC) ₆ C	0,24±0,04	8	1	7	88
(GAG) ₆ C	0,17±0,02	11	7	4	36

Наибольшее количество амплифицируемых фрагментов (ампликонов) и наиболее высокие показатели полиморфизма (в среднем на спектр ампликонов одного праймера) обнаруживается по IRAP-PCR маркерам по сравнению с ISSR-PCR маркерами (табл. 7). Пониженный полиморфизм по сравнению со всеми остальными выявлен в спектрах ампликонов праймера (GAG)₆C, первичная последовательность которого представлена пурип/пиримидиновым треком, предрасположенным к формированию вторичных структур ДНК (триплексы, G4 квадруплексы). Можно ожидать, что такой относительный консерватизм обусловлен повышенной предрасположенностью таких последовательностей к формированию сложных вторичных структур ДНК, в частности, к ДНК:РНК триплексам, вовлекаемым в регуляцию генной экспрессии (Antonov, Medvedeva, 2019), G4 квадруплексам, наличие которых типично в участках промоторов (Zybailov et al, 2013).

На основании частот встречаемости фрагментов геномной ДНК, фланкированных участками микросателлитов (ISSR-PCR маркеры) и LTR эндогенных ретровирусов (IRAP-PCR маркеры) рассчитаны генетические расстояния (DN, М. Ней, 1972) и построены дендрограммы, отражающие популяционно-генетические взаимоотношения между группами ящериц, отловленных в локалитете 1 (хутор Верхнекардаильский Волгоградской области) и локалитете 3 (хутор Средний Ставропольского края).

Построенные на основании частот встречаемости в спектрах ампликонов фрагментов ДНК разной длины, дендрограммы генетических взаимоотношений между исследованными животными с учетом половой принадлежности, свидетельствуют о том, что оценки генетической дифференциации между ними варьируют в зависимости от праймера.

Суммарно по спектрам продуктов амплификации всех праймеров

Половой диморфизм по величинам генетических дистанций по спектрам всех праймеров оказался выше в локалитете 1 по сравнению с локалитетом 3 (табл. 8).

Таблица 8. – Генетические дистанции (DN) между самками и самцами ящериц (по М. Нею, 1972)

Группы	Праймеры					
Самки/самцы	Sabrina	SIRE 1	(GAG) ₆ C	(TGC) ₆ C	(ACC) ₆ T	Все
Локалитет 3	0,0376	0,0892	0,1441	0,0450	0,0641	0,1340
Локалитет 1	0,0081	0,0148	0,0110	0,0343	0,0016	0,0184
Самцы/самцы	0,0754	0,1994	0,0543	0,2075	0,1886	0,1864
Самки/самки	0,0303	0,0585	0,0669	0,1006	0,1530	0,0856
Все особи	0,0237	0,0861	0,0282	0,1109	0,1573	0,0844

Генетические расстояния между всеми особями ящериц двух популяций в разных локалитетах всегда меньше индивидуальных дистанций между самцами в разных популяциях, но иногда превышают их между самками (табл. 8).

Кроме того, дистанции между самцами и самками локалитета 3 превышают расстояния суммарно между всеми особями, кроме дистанций, построенных по встречаемости фрагментов ДНК, фланкированных праймерами (TGC)₆C и (ACC)₆T (табл. 8).

Генетические дистанции между самцами двух локалитетов почти во всех случаях значительно превышают дистанции между самками (табл. 8). Исключение составляют генетические дистанции, рассчитанные по частотам встречаемости фрагментов ДНК, фланкированных праймерами (GAG)₆C и (ACC)₆T.

Зависимость полиморфизма ДНК-маркеров от локализации в референтном геноме прыткой ящерицы

Микросателлиты и ретротранспозоны являются наиболее полиморфными участками генома и удобными инструментами для описания популяционно-генетической структур разных видов (Блохин, Глазко, 2021; Календарь, Глазко, 2002). Одной из проблем использования таких маркеров в популяционно-генетических исследованиях являются отличия в полиморфизмах спектров продуктов амплификации, полученных в полимеразной цепной реакции, с использованием в качестве праймеров различных нуклеотидных последовательностей. Можно ожидать, что один из подходов к подбору наиболее полиморфных маркеров может быть выяснение колокализации в геномах участков гомологии к праймерам и нуклеотидных последовательностей, способствующих повышенной изменчивости таких районов. К последним могут относиться, в частности, ретротранспозоны и G4 квадруплексы (Capra et al., 2010). Нами проведен сравнительный анализ полиморфизма спектров продуктов амплификации прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), а также

локализации участков гомологии к праймерам вблизи транспозонов, квадруплексов G4, микроРНК в референтном геноме прыткой ящерицы.

Исходя из данных, представленных в таблице 9, полиморфизм ретротранспозонов и микросателлитов не зависит от выявленных рядом участков гомологии к мобильным генетическим элементам. Обнаруживается определенная негативная ассоциация между частотой встречаемости участков гомологии к микроРНК и плотностью G4 квадруплексов в рассматриваемых фрагментах референтного генома. Из этой ассоциации выпадают только участки, фланкированные инвертированным повтором микросателлита (GAG)₆C, частота встречаемости которого существенно выше остальных рассмотренных микросателлитов.

В общем, у прыткой ящерицы наблюдается тенденция к относительно пониженному полиморфизму ISSR-PCR маркеров по сравнению с IRAP-PCR маркерами в экспериментальных исследованиях и к повышенной плотности локализации в районах ISSR-PCR маркеров в референтном геноме прыткой ящерицы G4 квадруплексов (табл. 9).

Таблица 9. – Результаты анализа референтного генома прыткой ящерицы *Lacerta agilis* в (Linnaeus, 1758) и сопоставление с экспериментальными данными

Праймер	Кол-во амплифицируемых фрагментов	ДПЛ спектров амплифицируемых фрагментов, %	Кол-во участков гомологии в референтном геноме	Последовательности между инвертированными повторами длиной от 100 до 2000 н.	Мобильные генетические элементы	Квадруплексы без перекрытий	Квадруплексы с перекрытиями	МикроРНК
					Шт., в участках референтного генома длиной около 1000 нуклеотидов			
SIRE 1	16	88	17	0	2	6	98	14
Sabrina	19	100	21	0	1	6	1	43
(ACC) ₆ T	16	75	3314	21	1	8	658	36
(TGC) ₆ C	8	87,5	12350	476	2	17	1015	13
(GAG) ₆ C	11	36,4	37088	3216	2	13	1756	26

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из результатов исследования, можно сделать следующие выводы:

1. Наибольшее количество статистически значимых отличий по морфометрическим признакам обнаружено при сравнении ящериц локалитета 1 с ящерицами локалитета 3. Ящерицы самого южного локалитета - третьего - ожидаемо превосходили по морфометрическим параметрам ящериц других

изучаемых локалитетов, находящихся значительно севернее. В свою очередь показатели щиткования вовлекались в дифференциацию ящериц, в основном, при сравнении западного локалитета 4 со всеми остальными.

2. Наибольшая доля полиморфных локусов выявлена при использовании в качестве праймеров PCR фрагментов LTR Sabrina и SIRE 1, она составила 100%, наименьшая доля полиморфных локусов была получена в спектрах праймера (GAG)₆C – 36%.

3. По большинству фенотипических характеристик половой диморфизм был наиболее выражен у ящериц северного локалитета 1, по молекулярно – генетическим – у ящериц южного локалитета 3. Наибольшие фенотипические отличия между ящерицами разных локалитетов наблюдались между самками, по молекулярно – генетическим – между самцами.

4. Половой диморфизм по морфометрическим признакам наиболее выражен у ящериц локалитета с самой высокой антропогенной нагрузкой – локалитета 1, между самками и самцами ящериц обнаружено 16 статистически значимых отличий, между самцами и самками ящериц локалитета 2 выявлено только 4 отличия, между ящерицами локалитета 3 – 11, локалитета 4 – 8. При оценке выраженности полового диморфизма по показателям щиткования статистически значимые различия между самцами и самками наблюдались между ящерицами восточного и западного локалитетов 2 и 4.

Генетические дистанции между самками и самцами оказались больше у животных южного локалитета 3 (хутор Средний Ставропольского края), чем у ящериц северного локалитета 1 (хутор Верхнекардаильский Волгоградской области) по спектрам всех используемых праймеров.

5. Сравнительный анализ полиморфизма фрагментов геномной ДНК в экспериментальных исследованиях популяционно-генетических структур с использованием ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров и распределения участков гомологии к используемым в качестве праймеров в PCR нуклеотидных последовательностей в референтном геноме прыткой ящерицы позволяет предполагать определенную ассоциацию между плотностью G4 квадруплексов и полиморфизмом таких маркеров.

6. Прыткая ящерица является важной частью рациона 14 видов птиц из 8 семейств. Наибольшая доля прыткой ящерицы была обнаружена в погадках степной пустельги и большой белой цапли, что подчёркивает ресурсную значимость данного вида.

Практические рекомендации

В целях оценки и контроля состояния популяции различных видов позвоночных животных мы рекомендуем использовать комплексный анализ фенотипических признаков и полилокусное генотипирование с использованием в качестве праймеров микросателлитов и длинных концевых повторов эндогенных ретровирусов с последующим сопоставлением полученных результатов.

При оценке состояния популяции животных следует использовать такой критерий, как индивидуальное разнообразие самцов по сравнению с самками.

Для увеличения эффективности применения ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров в популяционно-генетических исследованиях. следует проводить предварительный анализ референтных геномов по распределению участков гомологии к потенциальным праймерам и их ассоциаций с частотой встречаемости G4 квадруплексов.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации.

1. **Блохин И.Г.**, Глазко В.И. Генетические и фенотипические характеристики в оценках популяционной дифференциации прыткой ящерицы / **И.Г. Блохин**, В.И. Глазко / Юг России: экология, развитие. – 2021. - Т. 16. - № 3. - С. 47- 58. - DOI: 10.18470/1992- 1098- 2021- 3- 47- 58.

2. **Блохин, И.Г.** Популяционно-генетическая структура восточной прыткой ящерицы *Lacerta agilis exigua* (Reptilia, Lacertidae), оцененная по ISSR-PCR и IRAP-PCR маркерам / **И.Г. Блохин**, В.И. Глазко // Естественные и технические науки. - 2021. - № 3 (154). - С. 62-70.

3. **Блохин, И.Г.** Подбор высокополиморфных маркеров для оценки генофондных особенностей собак различного происхождения // **И.Г. Блохин**, Г.И. Блохин, А.М. Васина, А.В. Диков, В.И. Глазко // Естественные и технические науки. – 2021. - № 11 (162). - С. 77-87. - DOI: 10.25633/ETN.2021.11.10.

Статьи в журналах, входящих в базу данных Web of Science, Scopus.

1. **Blokhin, I.G.** Phenotypic traits of sand lizard (*Lacerta agilis*) and the environmental factor effects / **I.G. Blokhin**, N.A. Veselova, G.I. Blokhin // BIO Web Conf. – 2022. - V. 43. – 14 P. - DOI: 10.1051/bioconf/20224303003.

2. Apashkin, P.S. ISSR and IRAP marker polymorphism association to its localization features in reference genomes of mammals and reptiles / P.S. Apashkin, **I.G. Blokhin**, V.I. Glazko, T.T. Glazko // In Review, Journal of Applied Genetics. – 2022. - DOI: 10.21203/rs.3.rs-1322155/v1.

Статьи в других изданиях.

1. **Блохин, И.Г.** Популяционно-генетическая динамика половой дифференциации / **И.Г. Блохин**, В.И. Глазко // Кролиководство и звероводство, 2021. - №3. - С. 42-54.
2. **Блохин, И.Г.** Популяционно-генетическая структура восточной прыткой ящерицы *Lacerta agilis exigua* (Reptiilia, Lacertidae), оцененная по ISSR-PCR и IRAP-PCR маркерам. / **И.Г. Блохин**, А.Н. Николаева, В.Н. Сотникова // В сборнике: Актуальные проблемы молодежной науки в развитии АПК. Материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции. - 2020. - С. 125-131.
3. **Блохин, И.Г.** Наличие и полиморфизм участков гомологии к мобильному генетическому элементу Sabrina у восточной прыткой ящерицы (*Lacerta agilis exigua*). / **И.Г. Блохин** // Сборник студенческих научных работ по материалам докладов 72-й Международной студенческой научно-практической конференции, посвященной 145-летию со дня рождения А.Г. Дояренко. - 2019. - С. 399-401.
4. **Блохин, И.Г.** Фенотипическая изменчивость прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (L., 1758), на полуострове Крым. / **И.Г. Блохин**, Л.М. Сашина // В сборнике: Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России, материалы 8-й Международной научно-практической конференции. - 2019. - С. 14-16.
5. **Блохин, И.Г.** Изменчивость фенотипических характеристик прыткой ящерицы. / **И.Г. Блохин** // В сборнике: Сохранение разнообразия животных и охотничье хозяйство России, материалы 9-й Международной научно-практической конференции. - 2022. - С. 14.