

УДК 598.112

doi:10.21685/2307-9150-2022-1-8

ПЦР-ПДРФ идентификация митохондриальных линий ящерицы Линдгольма *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae)

С. А. Луконина¹, О. А. Ермаков²^{1,2}Пензенский государственный университет, Пенза, Россия¹lanochkal@yandex.ru, ²oaermakov@list.ru

Аннотация. *Актуальность и цели.* Достоверное определение таксонов, имеющих слабые морфологические различия при значительной генетической дифференциации, имеет важное значение для изучения биологического разнообразия. Авторы поставили задачу разработать тест-системы с использованием ПЦР-ПДРФ метода для идентификации митохондриальных линий ящерицы Линдгольма *Darevskia lindholmi* (Szczerbak, 1962) – эндемика Крыма, распространенного исключительно в горной части полуострова. *Материалы и методы.* На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК *D. lindholmi* проведен поиск маркерных нуклеотидных замен, специфичных для каждой из линий, и сайтов узнавания рестрикционных эндонуклеаз HaeIII и TasI. *Результаты.* Использование рестриктазы HaeIII позволяет идентифицировать только одну, наиболее дифференцированную линию, в то время как рестриктаза TasI – все три известные митохондриальные линии. *Выводы.* Предлагаемая авторами тест-система является простым и надежным способом идентификации митохондриальных линий ящерицы Линдгольма и может успешно применяться при проведении скрининговых исследований.

Ключевые слова: рестрикционный анализ, цитохром *b*, митохондриальная ДНК, *Darevskia (saxicola)* комплекс

Для цитирования: Луконина С. А., Ермаков О. А. ПЦР-ПДРФ идентификация митохондриальных линий ящерицы Линдгольма *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae) // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2022. № 1. С. 85–90. doi:10.21685/2307-9150-2022-1-8

The PCR-RFLP identification of mitochondrial lines *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae)

S.A. Lukonina¹, O.A. Ermakov²^{1,2}Penza State University, Penza, Russia¹lanochkal@yandex.ru, ²oaermakov@list.ru

Abstract. *Background.* Reliable identification of animal taxa characterized by weak morphological differences and, at the same time, by significant genetic differentiation is essential condition for the study of biological diversity. The authors set the task of developing test systems using the PCR-RFLP method for the identification of mitochondrial lineages of the Crimean rock lizard *Darevskia lindholmi* (Szczerbak, 1962), an endemic of Crimea, which is distributed exclusively in the mountainous part of the peninsula. *Materials and methods.* Based on the analysis of the nucleotide sequences of the cytochrome *b* gene of the mitochondrial DNA of *D. lindholmi*, a search for marker nucleotide substitutions specific for each lineage and recognition sites for the HaeIII and TasI restriction endonucleases was

carried out. *Results.* The use of the HaeIII restriction enzyme makes it possible to identify only one, the most differentiated lineage, while the TasI restriction enzyme allows an identification of all three known mitochondrial lineages. *Conclusions.* The test system proposed by the authors is a simple and reliable method for identifying mitochondrial lineages of the Crimean rock lizard and can be successfully applied in screening studies.

Keywords: restriction analysis, cytochrome *b*, mitochondrial DNA, *Darevskia (saxicola)* complex

For citation: Lukonina S.A., Ermakov O.A. The PCR-RFLP identification of mitochondrial lines *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae). *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki = University proceedings. Volga region. Natural sciences.* 2022;(1):85–90. (In Russ.). doi:10.21685/2307-9150-2022-1-8

Введение

Ящерица Линдгольма, *Darevskia lindholmi* (Szczerebak, 1962) – единственный европейский представитель видового комплекса *Darevskia (saxicola)* и единственный эндемик видового статуса в герпетофауне Крыма [1–3]. В недавней работе [4], по данным анализа митохондриального гена цитохрома *b* (cyt *b*) нами установлено, что *D. lindholmi* обладает сложной генетической структурой. В составе вида обнаружены три митохондриальные линии: Common («общая»), населяющая большую часть территории Горного Крыма, Central («центральная»), обитающая в центральной части Крымских гор, разделяя ареал общей линии на западный и восточный участки, и Southwestern («юго-западная»), встречающаяся только на юго-западном побережье полуострова.

Ящерицы «центральной» линии имеют высокий уровень отличий (генетическая дистанция 4,6 %) от двух других, близких между собой линий (дистанция 0,9 %), характеризуются некоторыми специфическими особенностями фоллидоза и, по-видимому, являются отдельным таксоном, по крайней мере, подвидового уровня [4].

В случаях, когда определение таксонов, особенно близкородственных, по морфологическим признакам затруднено, наиболее точным методом идентификации является секвенирование первичных последовательностей генов ядерной и митохондриальной ДНК. Однако для решения рутинных таксономических задач и проведения скринингового анализа выборок оправдано использование методов молекулярной диагностики без применения секвенирования, в том числе метод ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов), который заключается в ПЦР-амплификации интересующего фрагмента и его расщеплении соответствующей эндонуклеазой рестрикции. Ранее была показана высокая разрешающая способность этого метода для идентификации трех подвидов прыткой ящерицы, *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758) [5].

Целью настоящей работы является анализ применимости метода ПЦР-ПДРФ для идентификации трех генетически дифференцированных форм ящерицы Линдгольма.

Материалы и методы

В исследовании использовались образцы тканей (части аутотомированного хвоста ящериц или фаланги пальцев передних конечностей, фиксированные в 96 % этаноле) 413 ящериц из 108 географических локалитетов.

ДНК выделяли стандартным солевым методом с лизированием протеиназой K [6].

Для амплификации гена *cyt b* использовалась пара праймеров LgLu – 5'-AACCRCYGTGTGTTCAACTA-3' и RtHr – 5'-GGYTTACAAGACCAGY GCTTT-3' [3]. Режим амплификации: начальная денатурация 95 °C (5 мин), затем 32 цикла (95 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 90 с) и конечная элонгация 72 °C (10 мин). Для приготовления реакционной смеси использовался набор «БиоМастер HS-Taq ПЦР» (Biolabmix, Russia).

ПЦР-фрагменты для секвенирования выделяли после их фракционирования в 6 % полиакриламидном геле элюцией высокосолевым раствором. Качество и количество ПЦР-продукта оценивали визуально. Секвенирование гена *cyt b* 92 образцов ящериц из 60 локалитетов было проведено на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с применением наборов BigDye® Terminator 3.1 (Applied Biosystems) и тех же праймеров, что использовались при амплификации. Последовательности депонированы в GenBank под номерами MT338842–MT338934.

Поиск маркерных замен, специфичных для каждой из митохондриальных линий, и сайтов рестрикции проводили в пакете программ MEGA 7.0.21 [7].

Продукты амплификации подвергали воздействию эндонуклеаз рестрикции HaeIII и TasI (“Thermo Scientific”). ПЦР-фрагменты гидролизовали в соответствии с протоколом производителя, добавляя 2 единицы активности фермента непосредственно к аликвотам амплификационных смесей (4 мкл). Электрофоретическое разделение фрагментов проводили в 6 % полиакриламидном геле в течение 30 мин (размер стекол 8 × 10 см) с последующим окрашиванием раствором бромистого этидия и визуализацией в УФ-свете. В качестве маркера молекулярных длин использовали набор фрагментов ДНК плазмиды pBR322, обработанной эндонуклеазой рестрикции HpaII (pBR/HpaII).

Результаты и обсуждение

Длина амплифицированного продукта гена *cyt b* составила 1226 пар нуклеотидов (пн), включая праймеры. Обнаружено 80 переменных позиций (7,1 % от общей длины фрагмента), из них 70 парсимони-информативных (6,2 %). У «центральной» линии было выявлено 33 специфические нуклеотидные замены, у «юго-западной» – 3, у «общей» – 4.

Анализ нуклеотидной последовательности *cyt b* показал наличие в ней четырех сайтов узнавания рестрикционной нуклеазы HaeIII (GG^vCC), три из которых были общими для двух митохондриальных линий («общей» и «юго-западной»). При обработке рестриктазой амплифицированный фрагмент расщепляется у «общей» и «юго-западной» линий, имеющих три сайта узнавания, на четыре фрагмента длиной 667, 339, 136 и 84 пн (рис. 1, лунки геля 1–6).

У ящериц «центральной» линии выявлено два варианта профилей рестрикции. Первый из них обусловлен отсутствием одного из общих для всех линий сайтов узнавания (позиции 703–706), в результате чего образуется характерный фрагмент длиной 423 пн (рис. 1, лунки геля 7 и 8). Второй

вариант, напротив, образуется за счет наличия дополнительного сайта (позиции 301–304), из-за которого фрагмент длиной 667 пн распадается на два схожих по длине фрагмента – 340 и 327 пн (рис. 1, лунка геля 9).

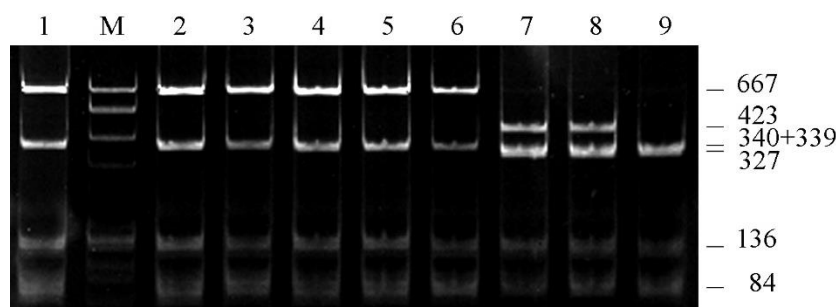


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции гена *cyt b* эндонуклеазой HaeIII при идентификации трех митохондриальных линий *Darevskia lindholmi*. Лунки геля: 1–3 – «общая» линия, 4–6 – «юго-западная» линия, 7–9 – «центральная» линия. Справа – длины фрагментов рестрикции, пн; М – маркер молекулярных длин pBR/HpaII

Использование рестриктазы HaeIII позволяет идентифицировать только «центральную» линию, тогда как «общая» и «юго-западная» линии имеют одинаковые паттерны рестрикции по количеству и подвижности фрагментов.

Для определения всех трех митохондриальных линий ящерицы Линдгольма применялась мелкощепящая рестриктаза *TasI* (AATT). Количество сайтов узнавания этой рестриктазы в последовательностях гена *cyt b* среди изученных линий составило от 8 до 10, из которых пять являлись общими для трех изученных линий, остальные 3–5 в разных сочетаниях образовывали фрагменты, свойственные только одной из линий. Большое количество сайтов расщепления позволило получить для каждой генетической линии специфичные профили рестрикции, хорошо визуализируемые на электрофореграммах в зоне длин от 200 до 500 пн (рис. 2). Характерными признаками «общей» линии являются фрагменты 281 и 255 пн (лунки геля 1–3), «юго-западной» – 446 и 290 пн (лунки геля 4–6), «центральной» – 446, 281 и 240 пн (лунки геля 7–9) (рис. 2).

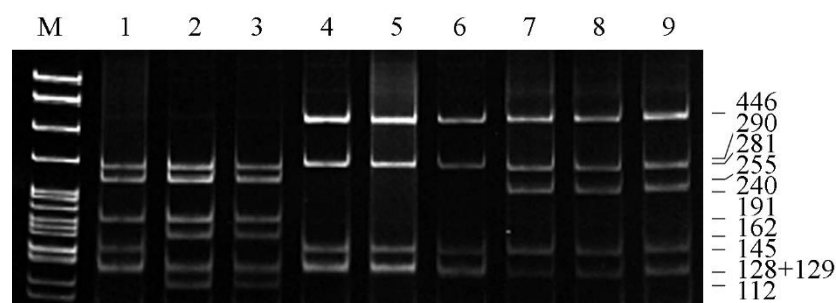


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции гена *cyt b* эндонуклеазой *TasI* при идентификации трех митохондриальных линий *Darevskia lindholmi*. Обозначения см. рис. 1

Разработанный подход использован для идентификации особей выборки ящериц Линдгольма ($n = 413$). Выявлено, что 277 проб принадлежат к «общей» линии, 41 проба – к «юго-западной» и 95 – к «центральной». Показано полное совпадение части результатов проведенного рестрикционного анализа ($n = 92$) с результатами идентификации генетических линий этих особей по данным секвенирования.

Заключение

Оценка применимости ПЦР-ПДРФ метода для идентификации митохондриальных линий ящерицы Линдгольма показала, что разработанная тест-система является относительно простой, недорогой и быстрой и может быть использована для массового анализа в научных и мониторинговых целях, что особенно важно при исследовании контактных зон ареалов линий (либо потенциальных таксонов).

Список литературы

1. Даревский И. С. Скальные ящерицы Кавказа (Систематика, экология и филогения полиморфной группы кавказских ящериц подрода *Archaeolacerta*). Л. : Наука, 1967. 214 с.
2. MacCulloch R. D., Fu J., Darevsky I. S. [et al.]. Genetic evidence for species status of some Caucasian rock lizards in the *Darevskia saxicola* group // *Amphibia-Reptilia*. 2000. Vol. 21. P. 169–176.
3. Доронин И. В., Туниев Б. С., Кукушкин О. В. Дифференциация и систематика скальных ящериц комплекса *Darevskia (saxicola)* (Reptilia, Lacertidae) по данным морфологического и молекулярного анализов // Труды Зоологического института Российской академии наук. 2013. Т. 317, № 1. С. 54–84.
4. Kukushkin O., Ermakov O., Gherghel I. [et al.]. The mitochondrial phylogeography of the Crimean endemic lizard *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae): Hidden diversity in an isolated mountain system // *Vertebrate Zoology*. 2021. Vol. 71. P. 559–576. URL: <https://doi.org/10.3897/vz.71.e62729>
5. Кукушкин О. В., Ермаков О. А., Иванов А. Ю. [и др.]. Филогеография прыткой ящерицы в Крыму по результатам анализа гена цитохрома *b*: древний рефугиум на полуострове, поздняя экспансия с севера и первые свидетельства гибридизации подвидов *Lacerta agilis tauridica* и *L. a. exigua* (Lacertidae: Sauria) // Труды Зоологического института Российской академии наук. 2020. Т. 324. С. 56–99. URL: <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2020.324.1.56>
6. Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // *Nucleic Acids Research*. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
7. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2016. Vol. 33. P. 1870–1874. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

References

1. Darevskiy I.S. *Skal'nye yashcheritsy Kavkaza (Sistematika, ekologiya i filogeniya polimorfnoy gruppy kavkazskikh yashcherits podroda Archaeolacerta) = Rock lizards of the Caucasus (Systematics, ecology and phylogeny of the polymorphic group of Archaeolacerta Caucasian lizards)*. Leningrad: Nauka, 1967:214. (In Russ.)
2. MacCulloch R.D., Fu J., Darevsky I.S. [et al.]. Genetic evidence for species status of some Caucasian rock lizards in the *Darevskia saxicola* group. *Amphibia-Reptilia*. 2000; 21:169–176.

3. Doronin I.V., Tuniev B.S., Kukushkin O.V. Differentiation and taxonomy of *Darevskia (saxicola)* (Reptilia, Lacertidae) rock lizards according to morphological and molecular analyzes. *Trudy Zoologicheskogo instituta Rossiyskoy akademii nauk = Proceedings of Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences*. 2013;317(1):54–84. (In Russ.)
4. Kukushkin O., Ermakov O., Gherghel I. [et al.]. The mitochondrial phylogeography of the Crimean endemic lizard *Darevskia lindholmi* (Sauria, Lacertidae): Hidden diversity in an isolated mountain system. *Vertebrate Zoology*. 2021;71:559–576. Available at: <https://doi.org/10.3897/vz.71.e62729>
5. Kukushkin O.V., Ermakov O.A., Ivanov A.Yu. [et al.]. Phylogeography of the quick lizard in the Crimea based on the results of the analysis of the cytochrome b gene: an ancient refugium on the peninsula, late expansion from the north, and the first evidence of subspecies hybridization of *Lacerta agilis tauridica* i L. a. *exigua* (Lacertidae: Sauria). *Trudy Zoologicheskogo instituta Rossiyskoy akademii nauk = Proceedings of Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences*. 2020;324:56–99. (In Russ.). Available at: <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2020.324.1.56>
6. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 1997;25:4692–4693. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
7. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33:1870–1874. Available at: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Информация об авторах / Information about the authors

Светлана Александровна Луконина

аспирант, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: lanochkal@yandex.ru

Svetlana A. Lukonina

Postgraduate student, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Олег Александрович Ермаков

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры зоологии и экологии, Пензенский государственный университет (Россия, г. Пенза, ул. Красная, 40)

E-mail: oaermakov@list.ru

Oleg A. Ermakov

Candidate of biological sciences, associate professor, associate professor of the sub-department of zoology and ecology, Penza State University (40 Krasnaya street, Penza, Russia)

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflicts of interests.

Поступила в редакцию / Received 08.02.2022

Поступила после рецензирования и доработки / Revised 25.02.2022

Принята к публикации / Accepted 11.03.2022