

ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗЕЛЕННЫХ ЯЩЕРИЦ (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)¹

© 2023 г. М. А. Доронина¹, И. В. Доронин¹*, С. А. Луконина²,
Л. Ф. Мазанова³, К. Ю. Лотиев^{4, 5}, Н. Б. Ананьева¹

¹Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Пензенский государственный университет, Пенза, 440026 Россия

³Дагестанский государственный университет, Махачкала, 367025 Россия

⁴Сочинский национальный парк, Сочи, 354002 Россия

⁵Комплексный научно-исследовательский институт
им. Х.И. Ибрагимова Российской академии наук, Грозный, 364051 Россия

*e-mail: igor.doronin@zin.ru

Поступила в редакцию 02.05.2022 г.

После доработки 28.05.2022 г.

Принята к публикации 03.06.2022 г.

ДНК-штрихкодирование остается признанным и широко используемым методом идентификации таксонов при инвентаризации и мониторинге биоразнообразия. В публикации мы приводим сведения о результатах использования этого метода при изучении зеленых ящериц рода *Lacerta*. Всего было проанализировано 67 последовательностей фрагмента гена *COI* трех видов (*L. agilis*, *L. media*, *L. strigata*). Впервые с помощью ДНК-штрихкодирования изучены все известные на Кавказе подвиды *L. agilis*, предложена филогеографическая гипотеза для *L. strigata* в кавказской части ареала. Генетическая идентификация была успешной на видовом уровне. В составе *L. agilis* в пределах Кавказа мы можем диагностировать только подвиды *L. a. boemica* и *L. a. exigua*, тогда как *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* и *L. a. mzymtensis* по выбранному маркеру неотличимы от *L. a. exigua*, а *L. a. ioriensis* от *L. a. boemica*.

Ключевые слова: *Lacerta agilis*, *Lacerta media*, *Lacerta strigata*, митохондриальная ДНК, *COI*.

DOI: 10.31857/S0016675823030037, **EDN:** INYJAE

Систематика и филогения зеленых ящериц рода *Lacerta* Linnaeus 1758, включающего по современным представлениям десять видов [1], в настоящее время претерпевает значительные изменения. Перспективным районом для исследования данных вопросов, по нашему мнению, является Кавказ [2, 3]. В пределах этого региона обитают три вида рода – прыткая, *L. agilis* Linnaeus 1758, представленная здесь шестью подвидами (*L. a. boemica* Suchow, 1929, *L. a. brevicaudata* Peters, 1958, *L. a. exigua* Eichwald, 1831, *L. a. grusinica* Peters, 1960, *L. a. ioriensis* Peters et Muskhelischwili, 1968 и *L. a. mzymtensis* Tuniyev et Tuniyev, 2008), номинативный подвид средней ящерицы – *L. m. media* Lantz et Cyrén, 1920, и монотипический вид полосатая ящерица – *L. strigata* Eichwald, 1831 ([4], www.lacerta.de). Филогенетические исследования *L. agilis* в Кавказском регионе не получили развития после рабо-

ты С.А. Калябиной-Хауф [5] и выхода ее совместной с Н.Б. Ананьевой монографии [6]. В настоящее время статус *L. a. boemica* предлагается повысить до видового (как в первоначальной публикации Г.Ф. Сухова [7]), в то время как ряд других кавказских подвидов свести в младшие синонимы *L. a. exigua* [6, 8]. Молекулярно-генетические исследования *L. a. ioriensis* и *L. a. mzymtensis* не проводились вовсе. Выходя за пределы Кавказа, отметим, что остается не решенным вопрос о таксономическом положении закарпатских популяций прыткой ящерицы [6, 9–11]. Слабо изучены филогеография и филогенетические взаимоотношения популяций *L. strigata* [12] в Кавказском регионе. Это относится и к *L. media* [13], при том что данный вид входит в надвидовой комплекс *Lacerta (trilineata)*, находящейся в фокусе исследований филогении рода *Lacerta* [1, 14].

Ранее в литературе были высказаны предположения о путях проникновения и расселения зеленых ящериц в Закавказье [15], реликтовом характере популяций полосатой ящерицы Терско-Кум-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675823030037 для авторизованных пользователей.

ской низменности, Кумо-Маньчской впадины [16] и Черноморского побережья Кавказа в Абхазии [17]. Одной из задач настоящего исследования являлась верификация этих предположений. Немаловажным является то обстоятельство, что ряд обозначенных таксонов зеленых ящериц включен в региональные и национальные списки охраняемых таксонов животных (Красные книги); это подчеркивает актуальность данного исследования с позиции изучения и сохранения биоразнообразия. Молекулярно-генетические данные позволяют выделить действительно уникальные популяции (за рамками принятой в настоящее время подвидовой систематики, во многом устаревшей — в случае с *L. agilis*) и обосновать необходимость их охраны. Остается актуальным и диагностика видов, поскольку во многих опубликованных работах и в базах данных по их распространению нами отмечены ошибки [18].

Сказанное выше указывает на необходимость более обстоятельного анализа филогеографии, систематики и распространения ящериц рода *Lacerta* на Кавказе и сопредельных территориях. Действенным методом в этой области продолжает оставаться ДНК-штрихкодирование (Biological identifications through DNA barcodes). В герпетологических исследованиях его эффективность показана для исследований на глобальном [19] и региональном [20–22] уровнях. Данный инструмент с успехом применяется и в исследованиях сложных в систематическом отношении групп ящериц [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения геномной ДНК были использованы части регенерированных хвостов, фаланги пальцев передних конечностей или кожные покровы ящериц, фиксированные в 96%-ном этаноле. Ваучерные экземпляры хранятся в коллекции Зоологического института РАН (ZISP; поддержание коллекции осуществлено в рамках проекта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2021-1069) и Зоологическом музее МГУ (ZMMU). В филогенетический анализ включены 67 последовательностей фрагмента митохондриального гена первой субъединицы цитохром оксидазы (*COI*) *L. agilis*, *L. media* и *L. strigata*, собранных в 50 локалитетах (Приложение, рис. 1). Из них 62 получены в ходе проведения данного исследования, пять взяты из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) [20–22].

В ходе изучения внешних морфометрических признаков, на которых строится систематика прыткой ящерицы [24], мы столкнулись с отсутствием надежных маркеров для диагностики ряда ее подвидов на Кавказе. По этой причине идентификация подвидов проводилась на основе сведений об их ареалах, согласно существующим на се-

годняшний день представлениям [6, 24–26]. Для сопоставления кавказских подвидов, относящихся к восточной группе [6], нами были использованы последовательности *COI* представителей западной группы подвидов — *L. agilis argus* (Laurenti, 1768) и закарпатской *L. agilis* ssp. Важно подчеркнуть, что в анализе использованы типовые экземпляры (голотип *L. a. mzymtensis* — ZISP24648) и топотипы (*L. a. boemica* — ZISP31113, *L. a. ioriensis* — ZISP29878), что делает наши выводы о систематике надежными и обоснованными.

Выделение тотальной ДНК проведено стандартным солевым методом с лизированием протеиназой K [27]. Амплификация участка гена *COI* (643 пн) осуществлялась с использованием универсальных праймеров UTF 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT TCT CAA CCA AYC AYA ARG AYA TYG G-3' и UTR 5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACT ARA CTT CTG GRT GKC CRA ARA AYC A-3' [28] при следующих условиях: начальная денатурация 95°C — 3 мин; затем 30 циклов 95°C — 30 с, 50°C — 30 с, 72°C — 50 с; завершающий синтез 72°C — 5 мин.

Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) содержала 50–100 нг ДНК, 0.5 мкМ каждого праймера, 0.2 мМ dNTPs, 1.5 мМ MgCl₂, 2.5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (10 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 50 мМ KCl) и 2 ед. Taq-полимеразы (Thermo Scientific). Секвенирование проводилось на генетическом анализаторе ABI PRIZM 3500xL (Applied Biosystems). Полученные последовательности были депонированы в GenBank NCBI (OM267788–OM267849).

Выравнивание последовательностей проведено в программах Geneious Prime 2021.0.1 (<https://www.geneious.com>) и AliView 1.6 [29]. Филогенетические отношения реконструированы с использованием метода Байеса (Bayesian analysis, BA) в программе Mr. Bayes 3.1.2 [30–32] и методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) в программном пакете MEGA X [33]. Для BA использованы 1.5 млн поколений; статистическая надежность узлов ML-деревьев оценена путем бутстреп-анализа (2000 псевдореplik). Устойчивость узлов дендрограмм филогенетических отношений в случае BA была оценена с помощью расчета апостериорных вероятностей. Уровни поддержки узлов: 0.95 — высокий, 0.90–0.95 — средний, менее 0.90 — неподдержанный; значения бутстреп-поддержек в ML-анализе: более 75% — достоверная, 50–75% — тенденция, менее 50% — отсутствие поддержки [34]. В качестве внешней группы выбраны последовательности *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823) (MN015068) и *Timon lepidus* (Daudin, 1802) (MN015075). Кроме того, в анализе задействована *L. trilineata* Bedriaga, 1886 (MN015090).

Выбор модели эволюции для нуклеотидных последовательностей проведен в программе MrModeltest 2.4 [35] с использованием инфор-

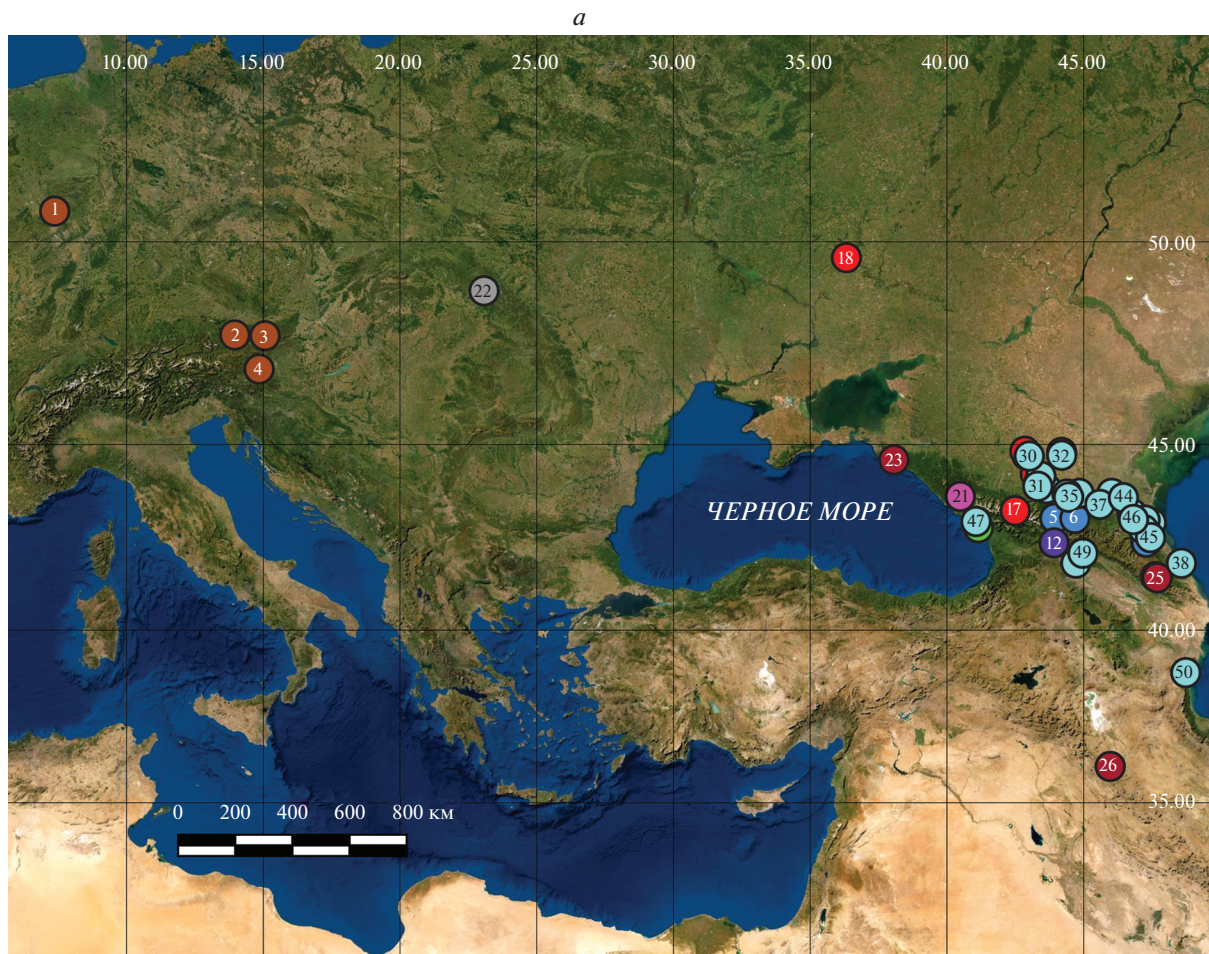


Рис. 1. Пункты сбора экземпляров *Lacerta*, использованных для молекулярно-генетического анализа: *a* – все виды, *б* – *L. agilis*, *в* – *L. media*, *г* – *L. strigata*. Нумерация соответствует таковой в приложении, цвет кружка соответствует таксону на рис. 2 и 3.

мационного критерия Акаике (AIC) – GTR (General Time Reversible) с параметрами $I = 0.3691$ и $G = 0.1844$. Графические изображения деревьев получены с помощью программы Fig-Tree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Построение сети гаплотипов осуществлялось методом TCS в программе PopART [36]. При анализе генетической изменчивости с использованием программы DnaSP v.5.10.01 [37] вычислены следующие параметры: общее количество полиморфных позиций (S), общее количество замен (η), количество гаплотипов (H), разнообразие гаплотипов (h), разнообразие нуклеотидов на сайт (π), среднее количество нуклеотидных замен (K), значение теста Таджимы (Tajima's D) и тест на нейтральность Фу (Fu's F_s). Генетические дистанции (p -дистанции) вычисляли в программе MEGA X.

Для проведения анализа таксономических границ по молекулярно-генетическим признакам использованы алгоритмы ASAP (Automated simultaneous analysis phylogenetics) [38] и ABGD (Auto-

matic barcode gap discovery) [39]. Они позволяют выявить условные молекулярные операционные таксономические единицы (Molecular phylogenetic taxonomic units, MOTU), представляющие собой монофилетические клады неопределенного ранга. Анализ проводили с использованием следующих параметров: P_{\min} (минимальная априорная дистанция) = 0.01, P_{\max} (максимальная априорная дистанция) = 0.1, X (относительная ширина интервала) = 0.5; была использована матрица попарных K80-дистанций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования получено 62 последовательности гена *COI* зеленых ящериц (OM267788–OM267849); ранее опубликованные пять последовательностей (KP697820, MN993135, MN993136, MN993138, MG815780) имели длину от 630 до 657 пн. 30 изученных последовательностей *L. agilis* образуют 17 гаплотипов (Нар 5–8, 10–15, 20, 22,

б

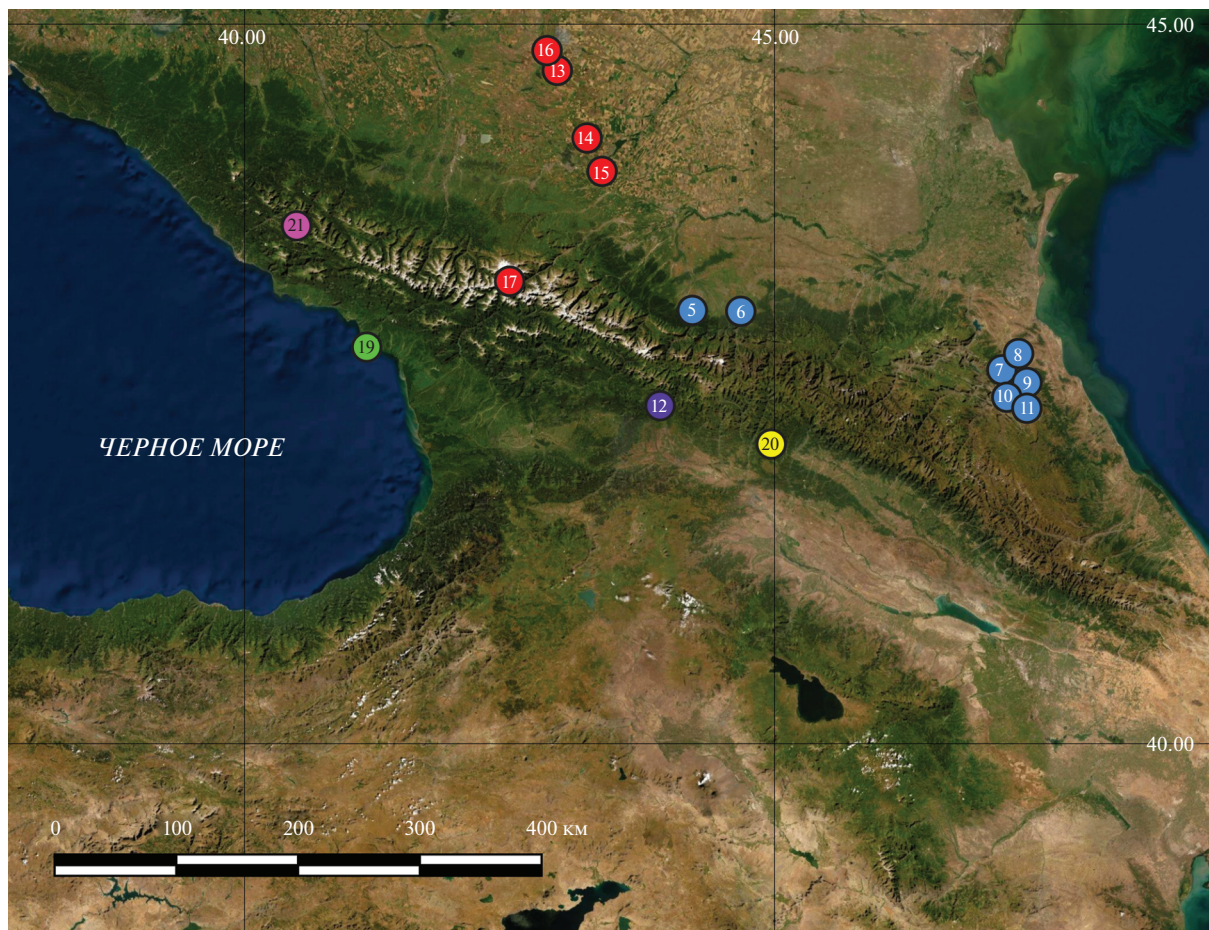


Рис. 1. Продолжение.

24–28); выявлены 54 (8.4% от общей длины фрагмента) переменные позиции, из них 43 (6.7%) парсимони информативные; соотношение транзаций к трансверсиям составило 7.6. Четыре последовательности гена *COI* *L. media* образуют три гаплотипа (Нар 16–18); выявлены 14 (2.2% от общей длины фрагмента) переменных позиций, из них – одна (0.2%) парсимони информативная; соотношение транзаций к трансверсиям составило 2.1. 33 последовательности *L. strigata* образуют семь гаплотипов (Нар 1–4, 9, 20, 22); выявлены 13 (2% от общей длины фрагмента) переменных позиций, из них – четыре (0.6%) парсимони информативные; соотношение транзаций к трансверсиям составило 7.7.

Показатели генетического разнообразия в выборке представлены в табл. 1. Относительно высокие значения гаплотипического и нуклеотидного разнообразия у прыткой ящерицы свидетельствуют о стабильной популяции с высокой численностью или о возможном вторичном контакте исторически разделенных популяций [40]. О возможном недавнем расселении полосатой ящерицы из ре-

фугиума могут говорить низкие значения показателей генетического разнообразия, а отрицательные достоверные показатели *D* – о наличии в прошлом внезапного роста популяции (экспансии) и/или положительного отбора [41].

Минимальное значение генетической дистанции (*p*-дистанции) найдено в паре видов *L. agilis*–*L. strigata* (10.1%), максимальное – *L. media*–*L. strigata* (11.8%) (табл. 2). По результатам реконструкции филогенетических взаимоотношений представителей рода *Lacerta* получены дендрограммы с идентичной топологией, на которых можно выделить пять клад с высокими бутстреп-поддержками (рис. 2). На полученной медианной сети гаплотипов (рис. 3) можно обозначить три гаплогруппы: I – *L. agilis* с тремя подгруппами (Ia – *argus*-группа, Ib – *boemica*-группа, Ic – *exigua*-группа), II – *L. media* и III – *L. strigata*. Наиболее удаленной от всех прочих является гаплогруппа III. От гаплогруппы I она отдалена на 25 нуклеотидных замен, от II – на 22. Анализ ASAP/ABGD показал наличие четкого разрыва между значениями подвиговой и видовой изменчивости (threshold distance =

6



Рис. 1. Продолжение.

= 2.9%, barcoding gap = 3.0%). Применение данных алгоритмов позволило выявить в объеме изученной выборки пять монофилетических MOTU.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изученные виды зеленых ящериц демонстрируют высокий уровень дифференциации по гену *COI*, т.е. на нашем материале была подтверждена его видоспецифичность. На полученной дендрограмме (рис. 2) первыми обособляются *L. trilineata*

и *L. media*, традиционно включаемые в *Lacerta (trilineata)* [14]. Это не соответствует опубликованному данным, полученным с использованием фрагментов как митохондриальных (*cytb*, *12S*, *16S*), так и ядерных (*C-mos*, β -*fib*) генов [12, 14]. Так, было показано, что отделение *L. strigata* произошло на более ранних этапах радиации рода *Lacerta* [12]. Это говорит о малой эффективности ДНК-баркода для изучения филогенетических взаимоотношений видов рода *Lacerta*. Следующими на дендрограмме обособляются *L. strigata*, и, наконец, *L. agilis*.

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия в изученных выборках зеленых ящериц рода *Lacerta*

Вид	<i>n</i>	<i>S</i> / η	<i>h</i>	π	<i>K</i>	Tajima's <i>D</i>	Fu's <i>F_s</i>
<i>L. agilis</i>	30	54/54	0.94 ± 0.02	0.029 ± 0.002	17.72	1.12 (<i>p</i> > 0.1)	0.89 (<i>p</i> > 0.1)
<i>L. media</i>	4	14/14	0.83 ± 0.02	0.011 ± 0.005	7.16	0.62 (<i>p</i> > 0.1)	2.08 (<i>p</i> > 0.1)
<i>L. strigata</i>	33	13/13	0.38 ± 0.11	0.002 ± 0.001	1.32	-1.90 (<i>p</i> < 0.05)	-1.62 (<i>p</i> < 0.05)

Примечание. *n* – объем выборки, *S* – общее количество полиморфных позиций, η – общее количество замен, *h* – разнообразие гаплотипов, π – разнообразие нуклеотидов на сайт, *K* – среднее количество нуклеотидных замен, значение Tajima's *D* – значение теста Таджимы и Fu's *F_s* – значение теста на нейтральность Фу.

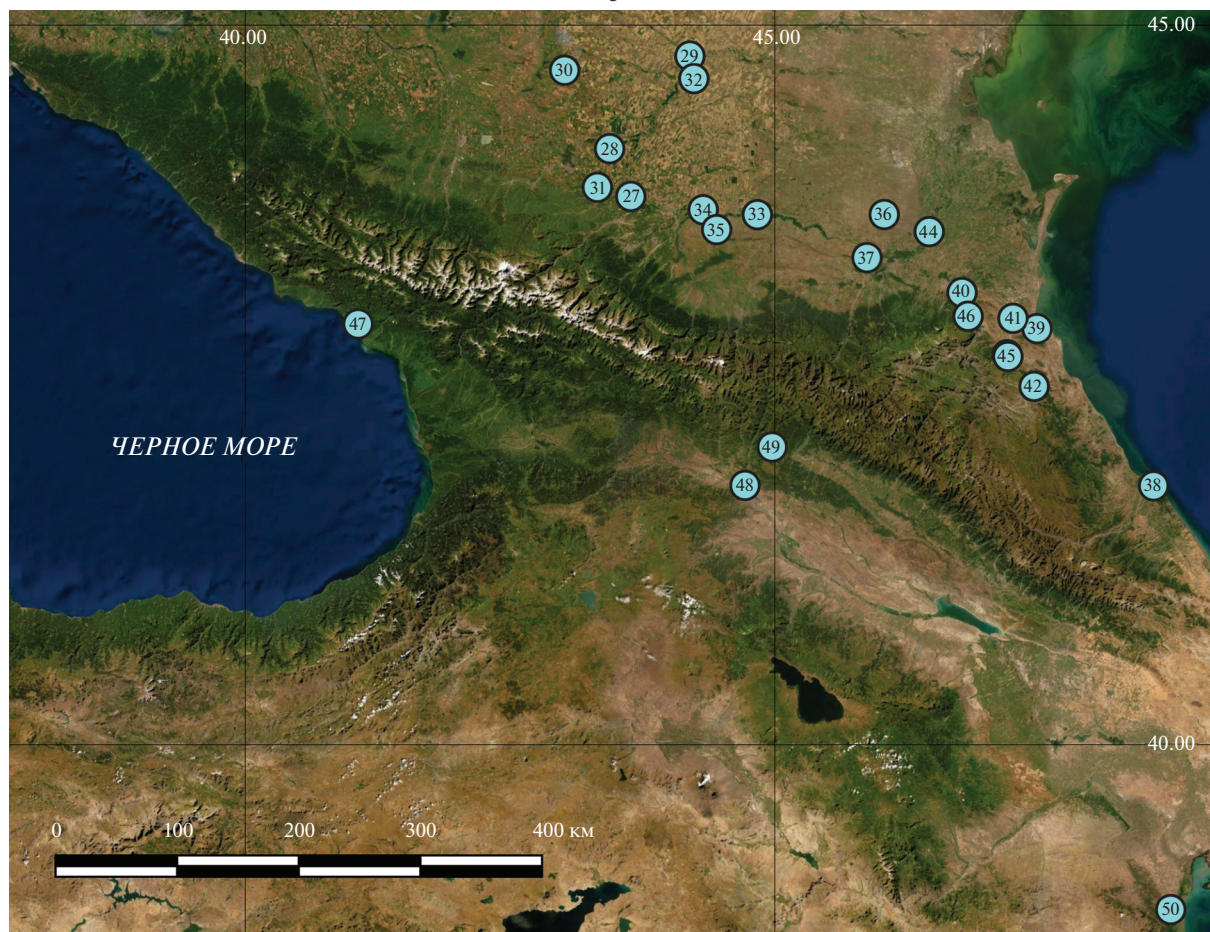


Рис. 1. Окончание.

Последовательности прыткой ящерицы, в свою очередь, сформировали три клады. Внутри *L. agilis* первой обособляется клада *L. a. boemica*, в которую вошла и *L. a. ioriensis* (p -дистанция 0.8%). Это подтверждает гипотезу о генетической близости иорской ящерицы и ящерицы Беме [15, 24, 25, 42]. Примечательно, что наиболее дистанцирована в этой выборке особь из расположенного в долине р. Терек г. Владикавказа (Нар 8). Вероятно в прошлом, в холодных перигляциальных условиях на Осетинской наклонной равнине существовали

Таблица 2. Средние генетические p -дистанции (%) (под диагональю) и их стандартные отклонения (над диагональю) между видами рода *Lacerta* по данным анализа последовательностей фрагмента гена *COI* (643 пн)

Вид	<i>L. strigata</i>	<i>L. agilis</i>	<i>L. media</i>
<i>L. strigata</i>		1.1	1.3
<i>L. agilis</i>	10.1		1.2
<i>L. media</i>	11.8	11.1	

изолированные микрорефугиумы этого таксона, приуроченные к долинам крупных рек. Косвенным подтверждением этого предположения может служить особь из близлежащего локалитета – г. Алагир в долине р. Ардон, также обладающая уникальным гаплотипом (Нар 6). Как и в предшествующих публикациях [6, 8] *L. a. boemica* продемонстрировала максимальные различия с другими подвидами *L. agilis* – 4.0–4.6% (табл. 3). В то же время отличия *L. a. boemica* от других подвидов не достигают уровня, сопоставимого с таковым между признаваемыми видами рода.

Закарпатская *L. agilis* ssp. сгруппировалась с *L. a. argus* из Австрии и Германии (p -дистанция 1.2%). Это согласуется с выводом К.Д. Мильто [43], основанном на изучении внешней морфологии. Публикации, в которых авторы отстаивают таксономическую самостоятельность закарпатских популяций на основе морфометрических признаков [9–11], не включали ее сравнение с подвидами

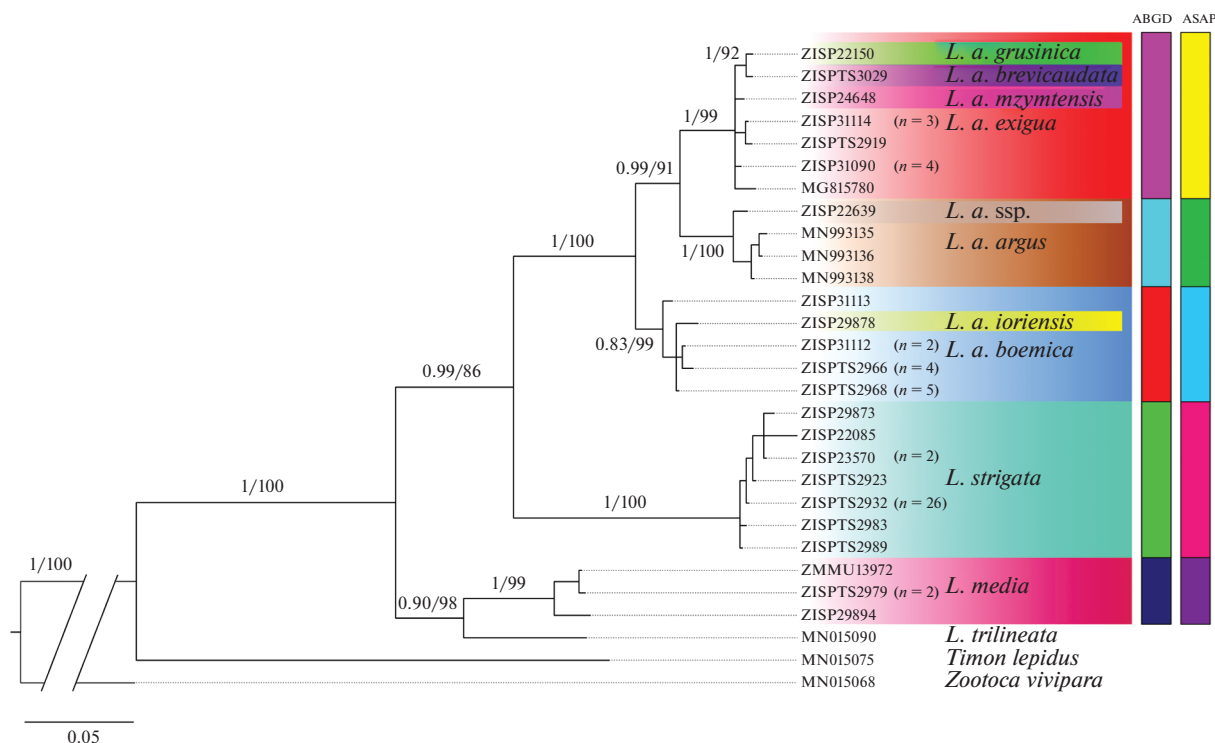


Рис. 2. Дендрограмма филогенетических отношений представителей рода *Lacerta* по результатам анализа фрагмента гена *COI* (643 пн). В узлах указаны байесовы апостериорные вероятности и бутстрэп-поддержки (BA/BS). Цветовое обозначение таксонов соответствует таковому на рис. 1. В двух столбцах разными цветами указаны выделенные молекулярные операционные таксономические единицы (MOTU).

западной группы (за исключением *L. a. chersonensis* Andrzejowski, 1832), в том числе с *L. a. argus*.

Эндемичные кавказские подвиды *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* и *L. a. mzymtensis* вошли в одну кладу с *L. a. exigua* (*p*-дистанция 0.3–0.8%). В ней же, по сравнению с другими кладами, наименее выражена структурированность. Ранее уже

было показано, что популяции *L. a. exigua* характеризуются настолько низкой изменчивостью митохондриального гена *cytb*, что географически удаленные популяции от Кавказа до Восточного Казахстана не имеют по этому маркеру значимых отличий [2, 6]. Это может свидетельствовать о быстром заселении прыткой ящерицей огромно-

Таблица 3. Средние генетические *p*-дистанции (%) (под диагональю) и их стандартные отклонения (над диагональю) между подвидами *Lacerta agilis* по данным анализа последовательностей фрагмента гена *COI* (643 пн)

Подвид	<i>L. a. argus</i>	<i>L. a. boemica</i>	<i>L. a. brevicaudata</i>	<i>L. a. exigua</i>	<i>L. a. grusinica</i>	<i>L. a. ioriensis</i>	<i>L. a. mzymtensis</i>	<i>L. a. ssp.</i>
<i>L. a. argus</i>		0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.4
<i>L. a. boemica</i>	4.6		0.8	0.8	0.8	0.3	0.8	0.8
<i>L. a. brevicaudata</i>	4.3	4.5		0.3	0.2	0.8	0.4	0.8
<i>L. a. exigua</i>	4.1	4.0	0.8		0.3	0.7	0.3	0.8
<i>L. a. grusinica</i>	4.3	4.5	0.3	0.8		0.8	0.4	0.8
<i>L. a. ioriensis</i>	4.7	0.8	4.2	3.9	4.2		0.8	0.8
<i>L. a. mzymtensis</i>	3.9	4.3	0.8	0.6	0.8	4.1		0.8
<i>L. a. ssp.</i>	1.2	4.5	4.2	3.8	4.2	4.6	3.7	

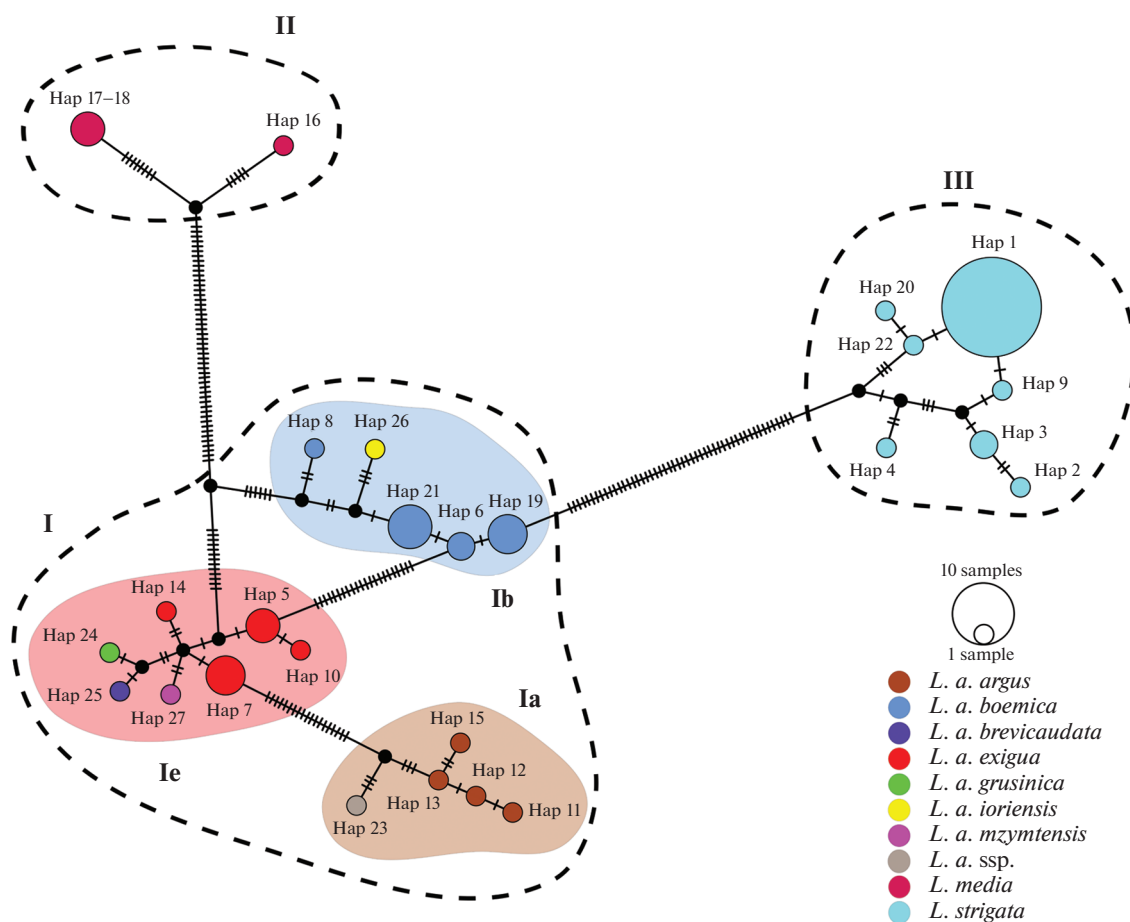


Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов *COI* (643 пн) представителей рода *Lacerta* Кавказа и сопредельной территории. Каждый цветной кружок – уникальный гаплотип, чей размер пропорционален встречаемости в выборке; цвет кружка соответствует подвидам на рис. 1 и 2. Соединительные линии – вероятные эволюционные связи, засечки – нуклеотидные замены, черные кружки в узлах линий – предсказанные гаплотипы. Пунктирной линией ограничены группы гаплотипов (I–III), цветной заливкой обозначены подгруппы гаплотипов *L. agilis* (Ia – *argus*-группа, Ib – *boeica*-группа, Ie – *exigua*-группа).

го пространства степной и лесостепной зон Евразии в конце позднего плейстоцена – голоцене [2].

Как и в специальной работе о филогеографии *L. media* по результатам анализа гена *cytb* [13], выборки с территории Большого Кавказа и Загроса, относимые к номинативному подвиду, продемонстрировали довольно значительную генетическую дистанцию друг от друга (p -дистанция 2.1%), превышающую межпопуляционную у других изученных таксонов зеленых ящериц.

Обращает на себя внимание выраженная звездчатая структура сети гаплотипов у *L. strigata*, характеризующаяся преобладанием массового гаплотипа Нар 1, доминирующего на Северном Кавказе (Приложение). Гаплотипы с территории Северной Осетии (Нар 9) и Дагестана (Нар 20, Нар 22) незначительно отличаются от него – на одну и три нуклеотидных замены соответственно. На территории и в окрестностях с. Буглена выявлено присут-

ствие трех из них (Нар 1, 20 и 22). Последовательность особи из г. Сухуми идентична таковой из г. Мцхета (Нар 3), притом что данные локалитеты находятся на удалении более 320 км друг от друга (соответственно, в границах Колхидской низменности и на южном склоне Большого Кавказа) и характеризуются совершенно различными физико-географическими условиями. Это говорит о расселении *L. strigata* на Черноморское побережье с юго-востока, а не с севера в обход Главного Кавказского хребта. Закавказье превосходит по гаплотипическому разнообразию Северный Кавказ, который был заселен, по-видимому, лишь на поздних этапах формирования видового ареала. В целом, несмотря на наличие изолированных популяций, значительно дистанцированных гаплотипов здесь не обнаружено, что, вероятно, может рассматриваться как свидетельство молодости ареала полозатой ящерицы в регионе.

Молекулярные операционные таксономические единицы строго соответствуют признаваемым видам рода *Lacerta* и не согласуются с подвидовой структурой прыткой ящерицы. Выявленные противоречия между принятой в настоящее время внутривидовой систематикой *L. agilis* и дифференциацией подвидов по *COI*, указывают на необходимость ее пересмотра с использованием более информативных генетических маркеров. В то же время ДНК-штрихкодирование может быть использовано для видовой диагностики зеленых ящериц Кавказа и сопредельных территорий.

Авторы признательны К.Д. Мильто, В.Ф. Орловой и Б.С. Туниеву за ценные консультации и помощь в работе.

Молекулярно-генетические исследования выполнены при финансовой поддержке гранта РФФ (№ 22-24-00079).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornilios P., Thanou E., Lymberakis P. et al. A phylogenomic resolution for the taxonomy of Aegean green lizards // *Zool. Scripta*. 2019. V. 49. № 1. P. 14–27. <https://doi.org/10.1111/zsc.12385>
2. 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) // *Тр. Зоол. ин-та РАН*. 2020. Т. 324. № 1. С. 56–99. <https://doi.org/10.31610/trudyzin/2020.324.1.56>
3. Доронина М.А., Доронин И.В., Луконина С.А. и др. Филогеография и систематика ящериц рода *Lacerta* (Lacertidae: Sauria) на Кавказе и сопредельных территориях // *Вопр. герпетологии: VIII съезд Герпетологического о-ва им. А.М. Никольского при РАН “Современные герпетологические исследования Евразии”*. Программа и тезисы докладов. Москва: КМК, 2021. С. 147–149.
4. Uetz P., Cherikh S., Shea G. et al. A global catalog of primary reptile type specimens // *Zootaxa*. 2019. V. 4695. № 5. P. 438–450. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4695.5.2>
5. Калябина-Хауф С.А. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц, *Lacerta agilis* L. 1758. Дисс. ... канд. биол. наук. СПб.: ЗИН РАН, 2003. 176 с.
6. Калябина-Хауф С.А., Ананьева Н.Б. Филогеография и внутривидовая структура широкоареального вида ящериц *Lacerta agilis* L., 1758 (Lacertida, Sauria, Reptilia) (опыт использования митохондриального гена цитохрома *b* // *Тр. Зоол. ин-та РАН*. Т. 302. СПб.: ЗИН РАН, 2004. 108 с.
7. Sookhov [Suchow] G.F. Description of a new species of lizards from the environs of Vladicaucasus (*Lacerta boemica* sp. nov.) // *Zbirnyk prats' Zoolohichnogo muzeyu*. 1929. I. 7. P. 117–119.
8. Andres C., Franke F., Bleidorn C. et al. Phylogenetic analysis of the *Lacerta agilis* subspecies complex // *Syst. and Biodiversity*. 2014. V. 12. № 1. P. 43–54. <https://doi.org/10.1080/14772000.2013.878000>
9. Песков В.Н., Бровко А.Ю. Изменчивость меристических признаков фolidоза и морфологическая дифференциация *Lacerta agilis* (Lacertidae, Sauria, Reptilia) на территории Украины // *Матер. Першої конференції Українського герпетологічного товариства*. Київ, 2005. С. 128–134.
10. Песков В.Н., Свириденко Е.Ю., Малюк А.Ю., Котенко Т.И. Половой диморфизм и определение пола по меристическим признакам фolidоза у прыткой ящерицы, *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 (Reptilia, Sauria, Lacertidae) // *Науковий вісник Ужгородського університету Серія Біологія*. 2010. Вып. 27. С. 140–144.
11. Песков В.Н., Свириденко Е.Ю., Малюк А.Ю., Котенко Т.И. Изменчивость фolidоза и дифференциация подвидов прыткой ящерицы, *Lacerta agilis* (Reptilia, Lacertidae), на территории Украины // *Вестник зоологии*. 2011. Т. 45. № 6. С. 541–554.
12. Saberi-Pirooz R., Rajabi-Maham H., Ahmadzadeh F. et al. Pleistocene climate fluctuations as the major driver of genetic diversity and distribution patterns of the Caspian green lizard, *Lacerta strigata* Eichwald, 1831 // *Ecol. Evol.* 2021. V. 11. № 11. P. 6927–6940. <https://doi.org/10.1002/ece3.7543>
13. Доронина М.А., Доронин И.В., Луконина С.А. и др. Филогеография *Lacerta media* Lantz et Cuyrén, 1920 (Lacertidae: Sauria) по результатам анализа митохондриального гена цитохрома *b* // *Генетика*. 2022 Т. 58. № 2. С. 177–186. <https://doi.org/10.31857/S0016675822020035>
14. Ghane-Ameleh S., Khosravi M., Saberi-Pirooz R. et al. Mid-Pleistocene transition as a trigger for diversification in the Irano-Anatolian region: Evidence revealed by phylogeography and distribution pattern of the eastern three-lined lizard // *Global Ecol. and Conservation*. 2021. V. 31. P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01839>
15. Мухелишвили Т.А. Возможные пути проникновения пресмыкающихся на территорию Грузии и некоторые характерные особенности их распространения // *Сообщения Академии наук Грузинской ССР*. 1970а. Т. 58. № 1. С. 209–212.
16. Тертышников М.Ф., Бадмаева В.И., Горювая В.И., Иванов В.Б. Материалы о распространении и экологии ящерицы полосатой на Северном Кавказе // *Фауна и экология животных Калмыкии и сопредельных районов*. Межвузовский сб. науч. трудов. Элиста: Калмыцкий гос. ун-т, 1984. С. 85–92.

17. Рудик А.М. О находке полосатой ящерицы (*Lacerta strigata* Eichwald) на Черноморском побережье Кавказа // Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Герпетологические исследования на Кавказе. Л.: ЗИН АН СССР, 1986. С. 187–188.
18. Доронина М.А., Доронин И.В. Анализ распространения зеленых ящериц рода *Lacerta* на Кавказе и сопредельных территориях // Совр. герпетология: пробл. и пути их решения. Матер. Второй междунар. молодежной конф. герпетологов России и сопред. стран, посвященной 100-летию отделения герпетологии Зоол. ин-та РАН. СПб.: ЗИН РАН, 2019. С. 48.
19. Murphy R.W., Crawford A.J., Bauer A.M. et al. Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles // Mol. Ecol. Res. 2013. V. 13. № 2. P. 161–167.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12050>
20. Hawlitschek O., Morinière J., Dunz A. et al. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany // Mol. Ecol. Resources. 2016. V. 16. № 1. P. 242–253.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12416>
21. Drohvalenko M., Mykhailenko A., Rekrotchuk M. et al. Application of DNA barcoding in taxonomy and phylogeny: An individual case of *COI* partial gene sequencing from seven animal species // Vestnik Zoologii. 2019. V. 53. № 5. P. 375–384.
<https://doi.org/10.2478/vzoo-2019-0034>
22. Zangl L., Daill D., Schweiger S. et al. A reference DNA barcode library for Austrian amphibians and reptiles // PLoS One. 2020. V. 15. № 3. P. e0229353.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229353>
23. Дунаев Е.А., Соловьева Е.Н., Поярко Н.А. Таксономия, филогения и распространение *Phrynocephalus* (superspecies *guttatus*) (Reptilia: Agamidae) // Совр. герпетология. 2020. Т. 20. Вып. 1/2. С. 16–34.
<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2020-20-1-2-16-34>
24. Даревский И.С., Щербак Н.Н., Петерс Г. и др. Систематика и внутривидовая структура // Прыткая ящерица. Монографическое описание вида / Отв. ред.: Яблоков А.В. М.: Наука, 1976. С. 53–95.
25. Мухелишвили Т.А. Пресмыкающиеся Восточной Грузии. Тбилиси: Мецниереба, 1970. 235 с.
26. Tuniyev S.B., Tuniyev B.S. Intraspecific variation of the Sand lizard (*Lacerta agilis*) from the Western Caucasus and description of a new subspecies *Lacerta agilis mzymtensis* ssp. nov. (Reptilia: Sauria) // Russ. J. Herpetology. 2008. V. 15. № 1. P. 55–66.
<https://doi.org/10.30906/1026-2296-2008-15-1-55-66>
27. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4692–4693.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
28. Lisovsky A.A., Obolenskaya E.V., Abramson N.I. et al. Geographic variation of *Microtus middendorffii* (Cricetidae, Arvicolinae, Rodentia) sensu lato studied by craniometrical and mitochondrial features // Russ. J. Theriol. 2010. V. 9. № 2. P. 71–81.
<https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.09.2.03>
29. Larsson A. AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets // Bioinformatics. 2014. V. 30. I. 22. P. 3276–3278.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
30. Huelsenbeck J., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. № 8. P. 754–755.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
31. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 12. P. 1572–1574.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
32. Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J.P., Ronquist F. Parallel metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference // Bioinformatics. 2004. V. 20. № 3. P. 407–415.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg427>
33. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. and Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
34. Felsenstein J. Inferring Phylogenies. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 664 p.
35. Nylander J.A.A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. 2004. <https://github.com/nylander/Mr-Modeltest2>
36. Leigh J.W., Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction // Meth. in Ecol. and Evol. 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
37. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 11. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
38. Sarkar I.N., Egan M.G., Coruzzi G. et al. Automated simultaneous analysis phylogenetics (ASAP): An enabling tool for phylogenomics // BMC Bioinformatics. 2008. V. 9. № 103. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-103>
39. Puillandre N., Lambert A., Brouillet S., Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation // Mol. Ecol. 2012. V. 21. № 8. P. 1864–1877.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
40. Абрамсон Н.И. Филогеография: итоги, проблемы, перспективы // Вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 2. С. 307–331.
41. Fu Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // Genetics. 1997. V. 147. P. 915–925.
<https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
42. Peters G., Muskhelishvili T.A. *Lacerta agilis ioriensis* – eine neue Subspecies der kaukasischen Zauneidechsen // Zool. Jb. Syst. 1968. V. 95. P. 213–228.
43. Milto K.D. On the Systematic Position of the Sand Lizard (*Lacerta agilis* Linnaeus, 1758) in the Western Ukraine // Russ. J. Herpetology. 1996. V. 3. № 2. P. 199–200.

Application of DNA Barcoding to the Study of Green Lizards (Sauria: Lacertidae: *Lacerta*)

M. A. Doronina^a, I. V. Doronin^{a, *}, S. A. Lukonina^b,
L. F. Mazanaeva^c, K. Yu. Lotiev^{d, e}, and N. B. Ananjeva^a

^aZoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 199034 Russia

^bPenza State University, Penza, 440026 Russia

^cDagestan State University, Makhachkala, Dagestan, 367025 Russia

^dSochi National Park, Sochi, 354002 Russia

^eIbragimov Complex Institute of the Russian Academy of Sciences, Grozny, 364051 Russia

*e-mail: igor.doronin@zin.ru

DNA barcoding remains a recognized and widely used method for taxon identification in biodiversity inventory and monitoring. In this publication, we present information about the results of using this method in the study of green lizards of the genus *Lacerta*. A total of 67 sequences of the *COI* gene fragment of three species (*L. agilis*, *L. media*, *L. strigata*) were analyzed. For the first time, all subspecies of *L. agilis* known in the Caucasus were studied using DNA barcoding, and a phylogeographic hypothesis for *L. strigata* in the Caucasian part of the range was proposed. Genetic identification has been successful at the species level. In the composition of *L. agilis* within the Caucasus, we can diagnose only the subspecies *L. a. boemica* and *L. a. exigua*, while *L. a. brevicaudata*, *L. a. grusinica* and *L. a. mzymtensis* are identical from *L. a. exigua*, while *L. a. ioriensis* from *L. a. boemica*.

Keywords: *Lacerta agilis*, *Lacerta media*, *Lacerta strigata*, mitochondrial DNA, *COI*.