

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 597/599; 591.9; 57.063.7; 575.86

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

Поступила в редакцию 17.07.2024

Received 17.07.2024

В. О. Молчан¹, Е. А. Куликова¹, Е. Э. Хейдорова¹, В. В. Демянчик²,
Е. В. Корзун¹, М. Е. Никифоров¹

¹Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

²Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Республика Беларусь

ВЕРИФИКАЦИЯ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ БЕЗНОГОЙ ЯЩЕРИЦЫ РОДА *ANGUIS*, ОБИТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Аннотация. В работе представлены обзор данных о распространении веретеницы на территории Беларуси и результаты молекулярно-генетической видовой идентификации по данным региона *COI* мтДНК 19 представителей рода *Anguis*, собранных в 13 административных районах 5 областей Беларуси (кроме Могилевской области) в период с 2018 по 2023 г. Установлено, что на территории Беларуси обитает только один вид безногих ящериц – колхидская веретеница (*Anguis colchica* Nordmann, 1840). Показано, что белорусская популяция вида характеризуется низкими значениями нуклеотидного ($\pi = 0,00090$) и гаплотипического ($Hd \pm SD = 0,351 \pm 0,111$) разнообразия и представлена двумя ранее не известными гаплотипами, отстоящими от гаплотипов других видов на генетическую дистанцию от 0,05740–0,05995 (*A. graeca*) до 0,09439–0,09694 (другие виды рода *Anguis*).

Ключевые слова: Squamata, Anguinae, митохондриальная ДНК, ДНК-баркодинг, *COI*, *Anguis colchica*, *Anguis fragilis*, Беларусь

Для цитирования: Верификация видовой принадлежности безногой ящерицы рода *Anguis*, обитающей на территории Беларуси / В. О. Молчан [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 271–279. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

Vladislav O. Molchan¹, Alena A. Kulikova¹, Ekaterina E. Kheidorova¹, Victor V. Demianchuk²,
Yahor V. Korzun¹, Michail E. Nikiforov¹

¹Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,
Minsk, Republic of Belarus

²Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Brest, Republic of Belarus

VERIFICATION OF SPECIES ASSIGNMENT OF THE LEGLESS LIZARD OF THE GENUS *ANGUIS* LIVING IN THE TERRITORY OF BELARUS

Abstract. The article presents an overview of the data on the distribution of the slowworm in Belarus and the results of molecular genetic species identification according to the mtDNA *COI* region of 19 representatives of the genus *Anguis* collected in 13 administrative districts of 5 regions of Belarus (except the Mogilev region) in the period 2018–2023. It has been established that only one species of legless lizards lives in the territory of Belarus – the Eastern Slowworm (*Anguis colchica* Nordmann, 1840). It was revealed that the Belarusian population of the species is characterized by low values of nucleotide ($\pi = 0.00090$) and haplotypic ($Hd \pm SD = 0.351 \pm 0.111$) diversity and is represented by two previously unknown haplotypes that are separated from haplotypes of other species by a genetic distance from 0.05740–0.05995 (*A. graeca*) to 0.09439–0.09694 (other species genus *Anguis*).

Keywords: Squamata, Anguinae, mitochondrial DNA, DNA barcoding, *COI*, *Anguis colchica*, *Anguis fragilis*, Belarus

For citation: Molchan V. O., Kulikova A. A., Kheidorova E. E., Demianchuk V. V., Korzun Y. V., Nikiforov M. E. Verification of species assignment of the legless lizard of the genus *Anguis* living in the territory of Belarus. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 271–279 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-271-279>

Введение. До сравнительно недавнего времени считалось, что веретеницы (лат. *Anguis*), род ящериц из семейства веретеницевых (Anguinae), представлен только одним видом – *Anguis fragilis* L., 1758, распространенным в пределах Западной Палеарктики.

Системных исследований этого рода в Беларуси не проводилось, поэтому по многим районам страны данные о частоте встречаемости веретеницы отсутствуют или фрагментарны. Известно, что на территории республики веретеница распространена мозаично и предпочитает смешанные, березовые, ольховые и сосновые леса, обитая преимущественно на полянах, опушках, вырубках,

просеках, по обочинам дорог. По данным Пикулика [1], в 1988 г. плотность населения веретеницы составляла в сосняках 0,02 (0–1) экз/га, в березняках – 2,5 (0–44,4), в ольшаниках – 0,4 (0–9,6), на обочинах дорог – 1,5 (0–50), на пойменных лугах озер – 1,7 (0–8,4) экз/га. По данным С. М. Дробенкова за 2018 г. [2], веретеница встречается в 3,5 % обследованных биоценозов с плотностью $14,5 \pm 1,6$ экз/га. На территории Минска веретеницы зарегистрированы в парках и лесопарках, расположенных чаще всего в периферической зоне города, где ее плотность составляет 11,1–33,6 экз/га [3]. В Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике, по данным В. Н. Лукашевича за 2008–2009 гг. [4], плотность веретеницы в березняках достигала 8,3 экз/га, в ольшаниках – 4,2, по берегам мелиоративных каналов – 2,1 экз/га.

Наиболее полная информация о веретенице в Беларуси представлена в монографии «Пресмыкающиеся Белоруссии» [1], где приведены морфометрические характеристики 12 самцов и 48 самок: длина тела, длина хвоста, длина головы, количество чешуй вокруг середины туловища, число брюшных щитков, вид слухового отверстия (открытое/закрытое). Проанализирован показатель изменчивости положения предлобных щитков, на основании которого в то время выделяли подвиды. В работе также перечислены варианты сочетания чешуй в теменной области, представлена изменчивость рисунка в дорсальной части тела.

На основании морфологических характеристик считалось, что единственным представителем безногих ящериц рода *Anguis* в Беларуси является вид ломкая веретеница (*Anguis fragilis*), который на подвиды не разделяется [5]. Советские герпетологи придерживались мнения, что на территории СССР обитает номинативный подвид *A. fragilis fragilis* L., а реальность существования подвида *A. fragilis colchica* (Normann, 1840) ставили под сомнение [6, 7]. Н. Н. Щербак и М. И. Щербань на основе детального анализа объемного материала из 226 экз. веретениц с территории Закарпатья (44 экз.), Прикарпатья (24 экз.), Молдавии (35 экз.), Украины (30 экз.), Беларуси и РСФСР (21 экз.), Предкавказья (60 экз.), Кавказа и Закавказья (12 экз.) пришли к выводу, что для выделения западных и восточных популяций в качестве отдельных подвидов нет оснований [6].

Однако широкое использование молекулярно-генетического анализа способствовало как возведению некоторых внутривидовых форм рептилий, уже известных своими популяционными различиями, в ранг полноценных видов даже в хорошо исследованных регионах, таких как Европа [8], так и дальнейшему изучению распространения отдельных видов, входящих в видовые комплексы, несмотря на трудности их однозначной морфологической идентификации [9]. Так, в результате недавних филогеографических исследований на основе как митохондриальных, так и ядерных локусов установлено, что род *Anguis* на территории Западной Палеарктики представлен пятью самостоятельными видами: *A. cephalonica* (Werner, 1894) – Пелопоннес, *A. fragilis* (Linnaeus, 1758) – Западная Европа, *A. colchica* (Nordmann, 1840) – восточная часть Европы и Западная Азия, *A. graeca* (Bedriaga, 1881) – Балканский полуостров и *A. veronensis* (Pollini, 1818) – от Апеннинского полуострова до юго-восточной Франции [10, 11]. При этом, согласно последним опубликованным данным [12], на основе анализа фенотипических признаков 326 веретениц из Центральной Европы установлено, что виды *A. fragilis* (веретеница ломкая) и *A. colchica* (веретеница колхидская) морфологически дифференцированы. Веретеница ломкая, по сравнению с колхидской, имеет менее крепкую голову, меньшее количество покровных чешуй, часто менее выраженные ушные отверстия и разделения предлобных щитков, при этом окраска тела взрослых ящериц больше похожа на окраску ювенильных особей. Следует отметить, что ни один из проанализированных признаков в отдельности не являлся диагностическим, но более 90 % всех особей могут быть успешно отнесены к тому или другому виду по количеству покровных чешуй. В зоне контакта двух видов веретеницы характеризуются промежуточной морфологией, но проявляют больше сходства с *A. fragilis*, чем с *A. colchica*.

Ввиду географического расположения Беларусь может включать зону интерградации ареалов двух видов веретениц – ломкой и колхидской, тем более что по данным ДНК-анализа веретеница колхидская отмечена в 12 км от границы с Беларусью (Vecsikeli; 55.892 N, 26.846 E) на территории Латвии и в 10 км (Marcinkonys; 54.04 N, 24.44 E) и 25 км (Paluše; 55.33 N, 26.10 E) от границы с Беларусью на территории Литвы [13]. В России на основной территории обитает веретени-

ца колхидская, в Калининградской области – ломкая [13]. В Польше наличие гаплотипов *A. colchica* было окончательно подтверждено с помощью молекулярного анализа, проведенного Gvoždík с соавт. [10, 11], которые выявили распространение этих видов на Малопольской возвышенности и Восточно-Европейской равнине юго-восточной и восточной Польши [14]. Это вызвало дискуссии о дифференциации обоих видов и зоне их контакта [15, 16]. Таким образом, современные генетические и хорологические данные свидетельствуют о вероятности ошибки в определении вида в прошлом, а также о возможности обитания в Беларуси обоих видов – *A. fragilis* и *A. colchica*. Первая отечественная работа, в которой отмечено, что на территории Беларуси обитает веретеница колхидская, а не ломкая, – это обзор герпетофауны Полесского государственного радиационно-экологического заповедника, сделанный В. А. Лукашевичем [4]. Автор ссылается на подтвержденные молекулярно-генетическими методами данные о видовой принадлежности особи веретеницы из Беларуси (аг. Доброволя, Свислочский район, Гродненская область; 52.884 N, 23.996 E) [14].

Цель исследования – провести ДНК-диагностику видовой принадлежности веретениц из разных точек Беларуси и оценить их генетическое разнообразие по митохондриальному маркеру *COI*. Несмотря на то что основные генетические исследования рода *Anguis* в Европе проводили по участку ND2 мтДНК [10, 11, 13, 14], нами выбран ген *COI*, так как данный регион мтДНК является наиболее консервативным и позволяет наблюдать эволюционное расхождение видов на большем временном отрезке, чем быстро меняющиеся гены субъединиц НАДН-дегидрогеназного комплекса.

Материалы и методы исследования. Всего проанализировано 19 образцов фрагментов мышечной ткани веретениц, полученных из 13 административных районов Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской и Минской областей Беларуси (рис. 1) в период с 2018 по 2023 г. Таким образом, репрезентативно охвачена территория, наиболее приближенная к предполагаемой границе соприкосновения ареалов видов *A. fragilis* и *A. colchica*.

Выделение ДНК проводили при помощи коммерческого набора Jena Bioscience (Animal and Fungi DNA Preparation Kit, Германия), согласно протоколу производителя. Качественные и количественные показатели выделенной ДНК оценивали на спектрофотометре NanoPhotometer P 330UV/Vis (IMPLEN, Германия). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, состоящей из 2,5 мкл 10xTaq-буфера («Праймтех», Беларусь), 2,5 мкл 10xdNTPs («Праймтех», Беларусь), 1,5 мкл 50 mM MgCl₂ («Праймтех», Беларусь), 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймеров, 0,1 мкл ДНК-полимеразы («АртБиоТех», Беларусь), 13,4 мкл dH₂O и 1 мкл ДНК, в амплификаторе модели BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler с использованием следующего протокола: первичная денатурация – 94 °C, 4 мин; 35 циклов денатурации (94 °C, 35 с), отжига (42 °C, 45 с), элонгации (72 °C, 1 мин); финальная элонгация – 72 °C, 7 мин. Участок гена митохондриальной ДНК *COI* амплифицировали с помощью универсальных праймеров LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAAGATATTGG-3')

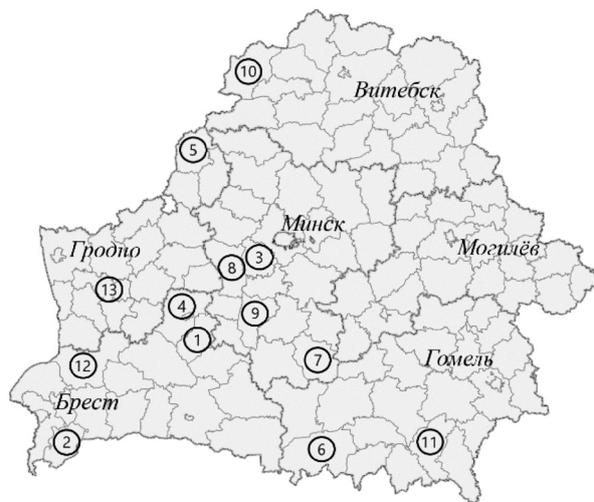


Рис. 1. Места сбора образцов биоматериала веретениц: Брестская обл.: 1 – Ляховичский р-н (Re6), 2 – Малоритский р-н (Re7, Re13), 4 – Барановичский р-н (Re18), 12 – Пружанский р-н (Re38, Re39); Витебская обл.: 10 – Браславский р-н (Re35, Re36); Гомельская обл.: 6 – Лельчицкий р-н (Re28, Re29), 11 – Хойникский р-н (Re23, Re37); Гродненская обл.: 5 – Островецкий р-н (Re19), 13 – Мостовский р-н (Re40, Re41); Минская обл.: 3 – Дзержинский р-н (Re17), 7 – Любанский р-н (Re32), 8 – Столбцовский р-н (Re33), 9 – Копыльский р-н (Re34)

Fig. 1. Collection sites of slow moth biomaterial samples: Brest region: 1 – Lyakhovichi district (Re6), 2 – Malorita district (Re7, Re13), 4 – Baranovichi district (Re18), 12 – Pruzhany district (Re38, Re39); Vitebsk region: 10 – Braslav district (Re35, Re36); Gomel region: 6 – Lelchitsy district (Re28, Re29), 11 – Khoyniki district (Re23, Re37); Grodno region: 5 – Ostrovets district (Re19), 13 – Mosty district (Re40, Re41); Minsk region: 3 – Dzerzhinsky district (Re17), 7 – Lyubansky district (Re32), 8 – Stolbtsy district (Re33), 9 – Kopylsky district (Re34)

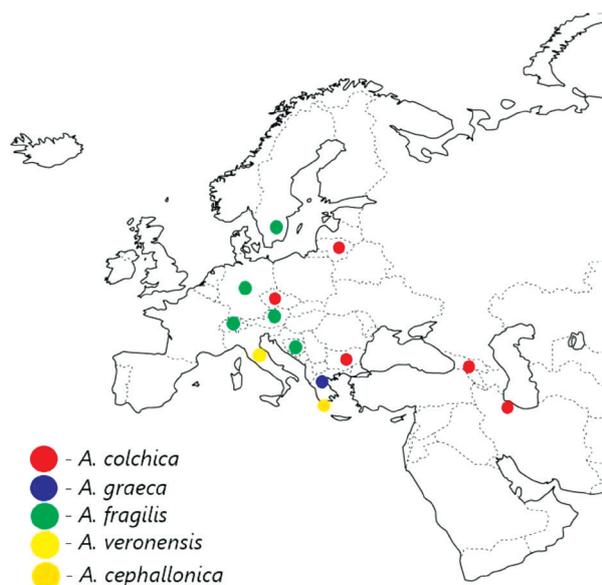


Рис. 2. Карта мест регистрации использованных для сравнительного анализа депонированных в NCBI нуклеотидных последовательностей *COI* мтДНК веретениц

Fig. 2. Registration maps of spindle moths used for a comparative analysis of the locations of the NCBI deposited nucleotide sequences of *COI* mtDNA

Германия; MW478002 – Швейцария; МК294755 – Босния и Герцеговина; КJ128664 – Швеция), 6 – *A. colchica* (OP493520 – Чехия; KX236330, OP493521 – Литва; OP493529 – Грузия; OP493522 – Иран; OP493523 – Болгария), 2 – *A. cephalonica* (KU052866, OP493528 – Пелопоннесский полуостров, Греция), 2 – *A. graeca* (KX236331, OP493517 – Греция), 2 – *A. veronensis* (KX236332, OP493530 – Италия) (рис. 2).

Байесовское филогенетическое дерево генетических различий построено при помощи программы MrBayes v3.2.7 [19] с использованием рассчитанной в программе MEGA X двухпараметрической модели Кимуры с учетом инвариантных сайтов. В качестве сторонних групп выбраны нуклеотидные последовательности участка *COI* прыткой ящерицы *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), размещенные в NCBI под кодами доступа MN993138, KP697866. Полученное дерево визуализировали с помощью FigTree v1.4.4 [20]. Для группировки образцов по гаплотипической принадлежности использовали программное онлайн-обеспечение FaBox 1.61 [21]. Показатели попарных и средних генетических дистанций между гаплотипами как внутри одного вида, так и между разными видами веретениц рассчитывали в MEGA X, применяя *neighbor-joining tree bootstrap* метод при 1 000 псевдорепликаций по двухпараметрической модели Кимуры с учетом замен по типу транзиций и трансверсий.

Параметры генетического разнообразия (число полиморфных сайтов, количество мутаций, среднее число нуклеотидных различий, число гаплотипов, гаплотипическое разнообразие, нуклеотидное разнообразие, а также попарные и средние генетические дистанции (D_{xy})) рассчитывали в программе DnaSP 6.12.01 [22].

Результаты и их обсуждение. Всего проанализировано 19 нуклеотидных последовательностей мтДНК белорусских веретениц длиной 392 п. н., представляющих фрагмент гена первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) с 5421-го по 5812-й сайт. Консервативность исследованного участка составила 99,7 %. При помощи программы BLAST (URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, по состоянию на 15.05.24) установлено статистически значимое соответствие в диапазоне 96,17–100,00 % полученных сиквенсов с аналогичными последовательностями вида *Anguis colchica*, имеющимися в базе Genbank, что подтверждает ошибочность определения белорусских веретениц как вида *A. fragilis* в прошлом.

и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA-3') [17]. Для визуализации результатов ПЦР применяли метод электрофореза в 1,4%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия, используя горизонтальную камеру Biorad MiniGel. Секвенирование полученных ампликонов осуществляли на генетическом анализаторе ABI313 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей по алгоритму ClustalW осуществляли в MEGA X [18], степень их подобия с расположенными в международной базе GenBank устанавливали при помощи программы BLAST. Для сравнения нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК представителей данного рода из различных регионов использованы также 19 образцов от всех известных видов безногих ящериц, обитающих на территории Западной Палеарктики. Образцы были взяты из базы данных нуклеотидных последовательностей NCBI: 7 нуклеотидных последовательностей *A. fragilis* (MN993078, MN993085 – Австрия; KP697879, KP697909 –

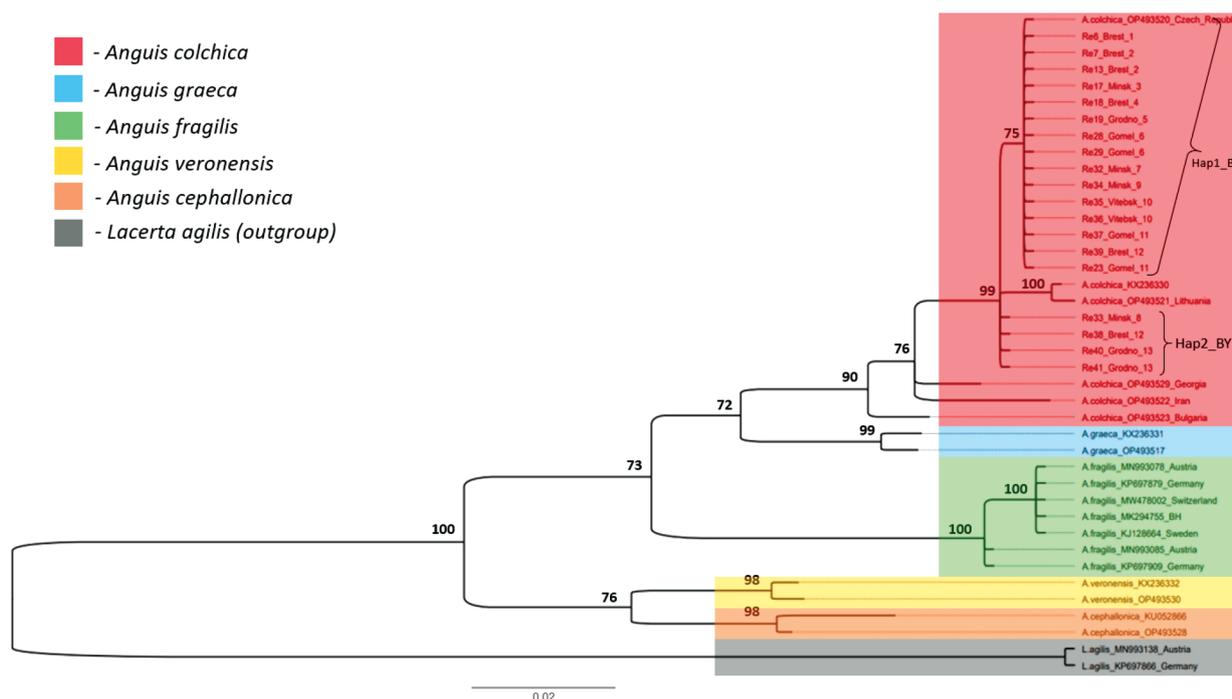


Рис. 3. Байесовское филогенетическое дерево различий между исследуемыми последовательностями *COI* мтДНК *A. colchica* из Беларуси и другими видами *Anguis*

Fig. 3. Bayesian phylogenetic tree of differences between the studied mtDNA *COI* sequences of *A. colchica* from Belarus and other *Anguis* species

На основе построенного байесовского филогенетического дерева можно выделить две основные клады (рис. 3). В первую кладу вошли все 19 образцов из Беларуси и 6 образцов *Anguis colchica* из GenBank (OP493520, KX236330, OP493521, OP493529, OP493522, OP493523), а также 2 образца *Anguis graeca* (GenBank: OP493517, KX236331) и 7 образцов *Anguis fragilis* (GenBank: MN993078, MN993078, KP697909, KP697879, MW478002, MK294755, KJ128664). Вторая клада сформирована образцами *Anguis veronensis* (KX236332, OP493530) и *Anguis cephalonica* (KU052866, OP493528) из GenBank. Все образцы кластеризовались в соответствии с видовой принадлежностью. Образцы из Беларуси сформировали общую группу с другими образцами *Anguis colchica*. Различия между видовыми кластерами характеризовались достоверными индексами псевдореplikаций (>90).

В проанализированных 19 нуклеотидных последовательностях белорусской популяции веретениц обнаружен 1 варибельный сайт в 480-й позиции от начала гена. Таким образом, всего для образцов веретениц из Беларуси обнаружено два гаплотипа. Наиболее распространенным оказался гаплотип 1 (Hap1_BY), к которому относилось 15 образцов из Беларуси и 1 образец колхидской веретеницы из Чехии (OP493520). Другие 4 образца (Re33, Re38, Re40, Re41) относились к гаплотипу 2 (Hap2_BY). Сравнительный анализ полученных нами и депонированных в базе NCBI нуклеотидных последовательностей гена *COI* мтДНК разных видов веретениц показал высокий уровень внутривидовой дифференциации гаплотипов. Следует подчеркнуть, что выявленные на территории Беларуси гаплотипы колхидской веретеницы ранее не были известны. Соотнесение выделенных гаплотипов с использованными в работе образцами веретениц представлено в табл. 1.

При анализе различий нуклеотидного состава между исследованными гаплотипами колхидских и ломких веретениц выделено 54 варибельных (V) и 40 парсимониально информативных (Pi) сайтов при длине анализируемого участка гена *COI* мтДНК в 392 нуклеотида. Данные по нуклеотидному составу и различиям проанализированных гаплотипов двух видов веретениц (*A. colchica* и *A. fragilis*) приведены в табл. 2.

Анализ показателей генетических дистанций (D_{xy}) внутри вида *Anguis colchica* продемонстрировал, что наименьшие значения были между обоими гаплотипами веретениц из Беларуси

Т а б л и ц а 1. Соотнесение выделенных гаплотипов с использованными в работе образцами веретениц

Table 1. Correlation of the isolated haplotypes with the samples of spindle moths used in the work

Гаплотип	Число сиквенсов	Сиквенсы, относящиеся к гаплотипу
Col1	1	<i>A. colchica</i> KX236330
Col2	1	<i>A. colchica</i> OP493529, Georgia
Col3	1	<i>A. colchica</i> OP493523, Bulgaria
Col4	1	<i>A. colchica</i> OP493522, Iran
Col5	1	<i>A. colchica</i> OP493521, Lithuania
Нap1_BY	16	<i>A. colchica</i> OP493520, Czech Republic; Re6, Re7, Re13, Re17, Re18, Re19, Re28, Re29, Re32, Re34, Re35, Re36, Re37, Re39, Re23
Нap2_BY	4	Re33, Re38, Re40, Re41
Fra6	2	<i>A. fragilis</i> MN993085, Austria; <i>A. fragilis</i> KP697909, Germany
Fra7	5	<i>A. fragilis</i> MN993078, Austria; <i>A. fragilis</i> KP697879, Germany; <i>A. fragilis</i> MW478002, Switzerland; <i>A. fragilis</i> MK294755 BH; <i>A. fragilis</i> KJ128664, Sweden
Ver8	1	<i>A. veronensis</i> KX236332
Ver9	1	<i>A. veronensis</i> OP493530
Сep10	1	<i>A. cephalonica</i> KU052866
Сep11	1	<i>A. cephalonica</i> OP493528
Gra12	1	<i>A. graeca</i> KX236331
Gra13	1	<i>A. graeca</i> OP493517

Т а б л и ц а 2. Сведения о нуклеотидном составе проанализированных гаплотипов участка гена *COI* мтДНК *A. colchica* и *A. fragilis* и различиях между нимиTable 2. Information on the nucleotide composition of the analyzed haplotypes of the *COI* gene region of mtDNA of *A. colchica* and *A. fragilis* and their differences

Haplotype	Сегрегирующий сайт*																										
	120	121	123	135	138	147	150	177	186	189	192	204	207	210	213	216	223	261	270	282	288	294	312	324	337	366	375
Col1	G	C	A	A	C	C	T	C	T	C	T	C	G	T	A	C	G	C	T	T	G	T	C	C	T	G	G
Col2	A	.	.	G	A	T	C	.	A	A	A	
Col3	C	.	.	.	A	.	G	.	A	T	C	.	A	A	
Col4	.	.	G	.	.	.	T	T	A	T	.	.	A	.	.	T	.	.	A	
Col5	T	
Нap1_BY	A	.	C	
Нap2_BY	A	.	C	
Fra6	.	T	.	.	.	A	C	T	.	T	.	T	.	A	.	T	A	T	C	C	A	C	T	.	C	.	A
Fra7	.	T	.	.	.	A	C	T	.	T	C	T	.	A	.	T	A	T	C	C	A	C	T	.	C	.	A
Haplotype	Сегрегирующий сайт*																										
	378	384	390	399	402	405	408	414	417	420	429	432	438	441	444	450	454	456	459	462	465	471	477	480	489	489	501
Col1	A	T	T	C	T	T	G	C	T	G	T	T	C	C	C	C	G	T	A	C	A	A	G	T	C	T	
Col2	.	.	C	.	.	C	T	A	
Col3	G	.	C	.	.	C	.	T	T	A	
Col4	.	C	C	T	A	.	.	T	
Col5	
Нap1_BY	C	A	.	.	
Нap2_BY	C	
Fra6	G	C	C	T	C	C	A	.	C	A	.	C	T	T	T	T	.	A	C	G	.	T	G	.	C	T	C
Fra7	G	C	C	T	C	C	A	.	C	A	C	C	T	T	T	T	.	C	C	G	.	T	G	.	C	T	C

П р и м е ч а н и е. * – от начала гена *COI*; полужирным выделены парсимониально информативные сайты (Pi); гаплотипы, относящиеся к виду *A. colchica*, – Col1, Col2, Col3, Col4, Col5, Нap1_BY, Нap2_BY; гаплотипы, относящиеся к виду *A. fragilis*, – Fra8, Fra9.

и гаплотипом Col5, к которому относился образец из Литвы, и Col1 (образец неизвестного происхождения). Наибольшие же значения по данному показателю установлены для гаплотипа Col4 из Ирана и Col3 из Болгарии (табл. 3).

Анализ Dxy между использованными в работе и сгруппированными по видовой принадлежности образцами видов рода *Anguis* показал, что наименьшие значения были между двумя гаплотипами *A. colchica* из Беларуси и видом *A. graeca*, обитающим на территории Балканского полуострова Греции (табл. 4). В целом же генетическая дистанция по маркеру *COI* между *A. colchica* и другими видами веретениц находилась на уровне 0,09439–0,09694.

Таблица 4. Показатели генетических дистанций между использованными в работе образцами видов рода *Anguis* и образцами из Беларуси

Table 4. Genetic distance indicators between the samples of species of the genus *Anguis* used in the work with samples from Belarus

Гаплотип	<i>A. fragilis</i>	<i>A. veronensis</i>	<i>A. graeca</i>	<i>A. cephalonica</i>
Нар1_BY	0,09694	0,09694	0,05995	0,09694
Нар2_BY	0,09439	0,09439	0,05740	0,09439

Рассчитанные показатели генетического полиморфизма для 19 образцов колхидской веретеницы из Беларуси характеризовались низкими значениями нуклеотидного и гаплотипического разнообразия (табл. 5).

Заключение. С использованием молекулярно-генетических методов установлена принадлежность 19 экземпляров веретеницы из 13 административных районов Беларуси к виду колхидская веретеница (*Anguis colchica*, Anguinae) и определены характеристики генетического разнообразия популяции по фрагменту *COI* митохондриальной ДНК. Сопоставление данных литературы и результатов собственных исследований позволило установить, что на территории Беларуси обитает только один вид безногих ящериц – колхидская веретеница. Образцов ДНК ломкой веретеницы (*Anguis fragilis*) на исследованной территории пяти областей Беларуси не обнаружено. Установлено, что белорусская популяция колхидской веретеницы характеризуется низкими значениями нуклеотидного ($\pi = 0,00090$) и гаплотипического ($Hd (\pm SD) = 0,351 \pm 0,111$) разнообразия и представлена двумя ранее не известными гаплотипами, отстоящими от гаплотипов других видов на генетическую дистанцию от 0,05740–0,05995 (*A. graeca*) до 0,09439–0,09694 (другие виды рода *Anguis*).

Таблица 3. Показатели генетических дистанций между использованными в работе образцами *Anguis colchica*, сгруппированными по гаплотипам

Table 3. Genetic distances between the *Anguis colchica* samples used in the work grouped by haplotypes

Гаплотип	Нар1_BY	Нар2_BY
Col1	0,01020	0,00765
Col2	0,02551	0,02296
Col3	0,03061	0,02806
Col4	0,03827	0,03571
Col5	0,01276	0,01020

Таблица 5. Показатели генетического разнообразия по митохондриальному гену *COI* для белорусской популяции колхидской веретеницы

Table 5. Genetic diversity indices for the mitochondrial gene *COI* for the Belarusian population of the Colchic slow worm

Показатель	Значение
N	19
H	2
V	1
Eta	1
Hd ($\pm SD$)	0,351 \pm 0,111
π	0,00090
k	0,351

Примечание. N – количество образцов, H – число гаплотипов; V – число переменных сайтов; Eta – количество мутаций; Hd – гаплотипическое разнообразие с учетом стандартного отклонения (SD); π – нуклеотидное разнообразие; k – среднее число нуклеотидных различий.

Список использованных источников

1. Пикулик, М. М. Пресмыкающиеся Белоруссии / М. М. Пикулик, В. А. Бахарев, С. В. Косов. – Минск: Наука и техника, 1988. – 166 с.
2. Дробенков, С. М. Современное состояние и возможности практического использования биологических ресурсов герпетофауны Беларуси / С. М. Дробенков // Природ. ресурсы. – 2018. – № 2. – С. 44–53.
3. Species diversity and ecology of amphibians and reptiles in urbanized landscapes of the city of Minsk / S. M. Drobekov [et al.] // Acta Biol. Univ. Daugavp. – 2021. – Vol. 21, N 2. – P. 89–100.

4. Лукашевич, В. Н. Обзор состояния видов класса Пресмыкающиеся (Reptilia) / В. Н. Лукашевич // Биологическое разнообразие животного мира Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / под ред. акад. М. Е. Никифорова. – Минск, 2022. – С. 72–80.
5. Гричик, В. В. Животный мир Беларуси. Позвоночные: учеб. пособие / В. В. Гричик, Л. Д. Бурко. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – 399 с.
6. Щербак, Н. Н. Земноводные и пресмыкающиеся Украинских Карпат / Н. Н. Щербак, М. И. Щербень. – Киев: Наук. думка, 1980. – 266 с.
7. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР / А. Г. Банников [и др.]. – М.: Просвещение, 1977. – 414 с.
8. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica / J. Speybroeck [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2020. – Vol. 41, N 2. – P. 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
9. The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones / D. Jablonski [et. al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2021. – Vol. 42, N 4. – P. 519–530. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10069>
10. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguillidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences / V. Gvoždík [et al.] // *Mol. Phylog. Evol.* – 2010. – Vol. 55, N 2. – P. 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.007>
11. An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguillidae), survived in the Italian Peninsula / V. Gvoždík [et al.] // *Mol. Phylog. Evol.* – 2013. – Vol. 69, N 3. – P. 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.004>
12. Phenotypic differentiation of the slow worm lizards (Squamata: *Anguis*) across their contact zone in Central Europe / N. Benkovský [et al.] // *PeerJ*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1–37. <https://doi.org/10.7717/peerj.12482>
13. Two species of slow worm (*Anguis fragilis*, *A. colchica*) present in the Baltic region / V. Gvoždík [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2021. – Vol. 42, N 3. – P. 383–389. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10055>
14. Phylogeography and postglacial colonization of Central Europe by *Anguis fragilis* and *Anguis colchica* / D. Jablonski [et al.] // *Amphibia-Reptilia*. – 2017. – Vol. 38, N 4. – P. 562–569. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003133>
15. Skórzewski, G. Remarks on the studies and occurrence of the eastern slow worm *Anguis colchica* incerta in Poland / G. Skórzewski // *Chrońmy Przyrodę Ojczyzn*. – 2017. – N 73. – P. 57–63.
16. Skórzewski, G. Morphological differentiation of Anguillidae Gray, 1825 in Poland: one or two species? / G. Skórzewski, B. Borezyk, B. Najbar // *Biologia płazów i gadów – ochrona herpetofauny*. – 2012. – P. 117–120.
17. DNA barcoding amphibians and reptiles / M. Vences [et al.] // *DNA Barcodes: Methods in Molecular Biology*TM / ed.: W. J. Kress, D. L. Erickson. – Totowa, NJ, 2012. – Vol. 858. – P. 79–107. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_5
18. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2018. – Vol. 35, N 6. – P. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
19. Huelsenbeck, J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // *Bioinformatics*. – 2001. – Vol. 17, N 8. – P. 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
20. Rambaut, A. Figtree ver 1.4.4 [Electronic resource] / A. Rambaut. – Edinburgh, 2018. – Mode of access: <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@FigTree@1.4.4>. – Date of access: 09.09.2024.
21. Villesen, P. FaBox: an online fasta sequence toolbox / P. Villesen // *Mol. Ecol. Notes*. – 2007. – Vol. 7, N 6. – P. 965–968. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>
22. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets / J. Rozas [et. al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2017. – Vol. 34, N 12. – P. 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

References

1. Pikulik M. M., Bakharev V. A., Kosov S. V. *Reptiles of Belarus*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1988. 166 p. (in Russian).
2. Drobenkov S. M. Present state and possible use of biological resources of the herpetofauna of Belarus. *Prirodnye resursy* [Natural resources], 2018, no. 2, pp. 44–53 (in Russian).
3. Drobenkov S. M., Korzun E. V., Kulikova A. A., Rizevich K. K. Species diversity and ecology of amphibians and reptiles in urbanized landscapes of the city of Minsk. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 89–100.
4. Lukashovich V. N. Review of the status of species of the class Reptiles (Reptilia). *Biologicheskoe raznoobrazie zhiivotnogo mira Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika* [Biological diversity of the fauna of the Polesie State Radiation and Ecological Reserve]. Minsk, 2022, pp. 72–80 (in Russian).
5. Grichik V. V., Burko L. D. *Fauna of Belarus. Vertebrates: tutorial*. Minsk, Publishing center of BSU, 2013. 399 p. (in Russian).
6. Shcherbak N. N., Shcherban M. I. *Amphibians and reptiles of the Ukrainian Carpathians*. Kyiv, Naukova dumka Publ., 1980. 266 p. (in Russian).
7. Bannikov A. G., Darevskii I. S., Ishchenko V. G., Rustamov A. K., Shcherbak N. N. *Key to amphibians and reptiles of the fauna of the USSR*. Moscow, Prosveshchenie Publ., 1977. 414 p. (in Russian).
8. Speybroeck J., Beukema W., Dufresnes C., Fritz U., Jablonski D., Lymberakis P. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia-Reptilia*, 2020, vol. 41, no. 2, pp. 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
9. Jablonski D., Sillero N., Oskyrko O., Bellati A., Čeirāns A., Cheylan M. [et al.]. The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones. *Amphibia-Reptilia*, 2021, vol. 42, no. 4, pp. 519–530. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10069>

10. Gvoždík V., Jandzik D., Lymberakis P., Jablonski D., Moravec J. Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, vol. 55, no. 2, pp. 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.01.007>
11. Gvoždík V., Benkovský N., Crottini A., Bellati A., Moravec J., Romano A. An ancient lineage of slow worms, genus *Anguis* (Squamata: Anguidae), survived in the Italian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, vol. 69, no. 3, pp. 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.004>
12. Benkovský N., Moravec J., Gvoždíková Javůrková V., Šifrová H., Gvoždík V., Jandzik D. Phenotypic differentiation of the slow worm lizards (*Squamata: Anguis*) across their contact zone in Central Europe. *PeerJ*, 2021, vol. 9, pp. 1–37. <https://doi.org/10.7717/peerj.12482>
13. Gvoždík V., Harca Z., Hánová A., Jablonski D., Pupins M., Čeirāns A., Paasikunnas T. Two species of slow worm (*Anguis fragilis*, *A. colchica*) present in the Baltic region. *Amphibia-Reptilia*, 2021, vol. 42, no. 3, pp. 383–389. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10055>
14. Jablonski D., Najbar B., Grochowalska R., Gvoždík V., Strzała T. Phylogeography and postglacial colonization of Central Europe by *Anguis fragilis* and *Anguis colchica*. *Amphibia-Reptilia*, 2017, vol. 38, no. 4, pp. 562–569. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003133>
15. Skórzewski G. Remarks on the studies and occurrence of the eastern slow worm *Anguis colchica* incerta in Poland. *Chrońmy Przyrodę Ojczyznę*, 2017, no. 73, pp. 57–63.
16. Skórzewski G., Borczyk B., Najbar B. Morphological differentiation of Anguidae Gray, 1825 in Poland: one or two species? *Biologia Plazów I Gadów – Ochrona Herpetofauny*, 2012, pp. 117–120.
17. Vences M., Nagy Z. T., Sonet G., Verheyen E. DNA barcoding amphibians and reptiles. *DNA Barcodes: Methods in Molecular Biology*TM. Totowa, NJ, 2012, vol. 858, pp. 79–107. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_5
18. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
19. Huelsenbeck J. P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, no. 8, pp. 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
20. Rambaut A. *Figtree ver 1.4.4. Edinburgh, 2018*. Available at: <https://bioweb.pasteur.fr/packages/pack@FigTree@1.4.4> (accessed 09.09.2024).
21. Villesen P. FaBox: an online fasta sequence toolbox. *Molecular Ecology Notes*, 2007, vol. 7, no. 6, pp. 965–968. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01821.x>
22. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E., Sánchez-García A. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, vol. 34, no. 12, pp. 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Інфармацыя аб аўтарах

Молчан Владислав Олегович – м.л. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1070-1938>. E-mail: molchan_vladislav@mail.ru

Куликова Елена Александровна – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-0798-9723>. E-mail: elen.kulikova@gmail.com

Хейдорова Екатерина Эдуардовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: hejkat@mail.ru

Демянчик Виктор Викторович – науч. сотрудник. Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Советских Пограничников, 41, 220030, г. Брест, Республика Беларусь). E-mail: koktebel.by@mail.ru

Корзун Егор Викторович – ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natrix109@gmail.com

Никифоров Михаил Ефимович – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikif@tut.by

Information about the authors

Vladislav O. Molchan – Junior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1070-1938>. E-mail: molchan_vladislav@mail.ru

Alena A. Kulikova – Senior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-0798-9723>. E-mail: elen.kulikova@gmail.com

Ekaterina E. Kheidorova – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hejkat@mail.ru

Victor V. Demianchik – Researcher. Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (41, Sovetskih Pogranichnikov Str., 220030, Brest, Republic of Belarus). E-mail: koktebel.by@mail.ru

Yahor V. Korzun – Senior Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natrix109@gmail.com

Michail E. Nikiforov – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikif@tut.by