

УДК 577.21.6

ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФИЛОГЕНЕТИКИ НА ПРИМЕРЕ ОТРЯДА ЧЕШУЙЧАТЫХ РЕПТИЛИЙ (ОТРЯД SQUAMATA): МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ДНК-МАРКЕРЫ

© 2013 г. В. В. Гречко*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 199911

Поступила в редакцию 12.07.2012 г.

Принята к печати 05.09.2012 г.

Рассмотрено современное состояние филогенетики, основанной на сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК митохондрий и хромосом. Основное внимание уделено мтДНК-маркерам, широко используемым в молекулярной эволюции, однако во многих случаях без критического рассмотрения физиологических и биохимических особенностей митохондрий, которые влияют на адекватность и достоверность результатов. Помимо обстоятельности, затрудняющих трактовку филогении на основе мтДНК-маркеров (нераспознавание событий гибридизации и интрогрессии, анцестральный полиморфизм, паралогизация митохондриальных генов в ядре), особое внимание уделено ненейтральности и неравномерности мутирования митохондриальных генов и их частей, нарушению однородительского наследования митохондрий и рекомбинационным событиям, естественной гетероплазмии и гаплотипическому разнообразию мтДНК. Эти факторы могут разрушать однозначную трактовку филогенетических выводов и приводить к неконгруентности деревьев, построенных на основе разных мтДНК-маркеров, а также митохондриальных и ядерных маркеров, на одних и тех же объектах. Поддерживается высказываемая рядом авторов точка зрения, согласно которой митохондриальные гены и их фрагменты не могут служить надежными маркерами эволюционного процесса, если их применение не сопровождается тщательным изучением условий существования и жизнедеятельности таксонов. К сожалению, смоделировать и проконтролировать условия, влияющие на метаболизм и физиологическое состояние митохондрий, вряд ли возможно в полном объеме. Предполагается, что ценность мтДНК как филогенетического маркера связана, прежде всего, с возможностью анализа полных ее структур не столько для сравнения последовательностей нуклеотидов, сколько с целью выявления апо- и синапоморфных признаков, характерных для таксона, и поисков информативных — для филогеографических исследований и оценки относительных эволюционных времен — ядерных паралогов мтДНК.

Ключевые слова: молекулярная филогенетика, рептилии, Squamata, мтДНК-маркеры, гетероплазмия, паралогизация митохондриальных генов, рекомбинация мтДНК, ненейтральность эволюции мтДНК.

THE PROBLEMS OF MOLECULAR PHYLOGENETICS ON THE EXAMPLE OF SQUAMATA REPTILES. MITOCHONDRIAL DNA MARKERS, by V. V. Grechko* (Engelgardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 199911 Russia; *e-mail: grechkovv@yandex.ru). The review is devoted to the recent problems of molecular phylogenetics based on the mitochondrial and chromosomal DNA sequences. The main subjects of the paper are the most widely used mtDNA markers though their application is not well enough (of critically considered) supported from the point of physiology and biochemistry of these organelles. Besides some well known aspects embarrassing the mt-markers phylogeny interpretations (hybridization and introgression events, ancestral polymorphism and nuclear paralogs of mtDNA) the attention is concentrated on non-neutrality and disproportional mutability of mt-genes and their fragments, on uniparental inheritance violations, recombinational events and heteroplasmy. These factors may influence the congruence of phylogenetic inferences and trees based on different mt-markers and when they compared with nuclear markers. Many authors suppose that the sequence comparisons of mt-genes and their fragments alone are not adequate to the studies of evolution. The notion is put forward that the influence of external conditions on metabolism and physiology of mitochondria could not be fully taken into account and modelled to be applied for phylogenetic tasks. The values of mt-markers could be revealed by the comparison of the whole mtDNA sequences of different taxa and searching the informative syn- and apomorphic properties and nuclear paralogs.

Keywords: molecular phylogenetics, mtDNA markers, reptiles, Squamata, heteroplasmy, mt-genes paralogs, mtDNA recombination, non-neutrality of mtDNA evolution.

DOI: 10.7868/S0026898413010059

* Эл. почта: grechkovv@yandex.ru

“...obtaining a strongly supported tree does not necessary mean that it is correct.”
Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. 2005

ВВЕДЕНИЕ

Область исследования эволюции живых организмов, основанная на сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК митохондрий и хромосом (молекулярная филогения, филогенетика), возникла на фоне глубокого кризиса классических морфологических методов изучения таксономии и эволюции и породила эйфорию в надежде найти молекулярно-генетические инструменты их познания. Многие (см., например [1, 2]), как и автор настоящего обзора [3], еще 10–15 лет тому назад придерживались точки зрения, что, несмотря на трудности анализа и интерпретации филогенетических данных, здесь имеется мощный потенциал для получения как общей картины эволюции, так и эволюции отдельных таксонов. В то же время возник вопрос, насколько “генная” филогения помогает осмыслить понятие вида и его эволюцию (например [4–7]). Предполагалось, что математические и статистические методы анализа множеств нуклеотидных последовательностей помогут смоделировать свойства их эволюции, не поддающиеся экспериментальному изучению.

Очевидна важность и необходимость разработки и усовершенствования методов математического моделирования и статистического обоснования событий эволюции, но нельзя не отметить, что в большинстве случаев неконгруентность результатов наблюдается и при сравнении топологий деревьев по митохондриальным и ядерным маркерам, и внутри каждой из этих групп (по разным маркерам) при том, что разные топологии практически одинаково поддерживаются статистически. Эта проблема возникала при использовании разных методов математического анализа одного и того же набора данных [4–8]. В некоторых случаях анализ приводил к более или менее сходным филогенетическим построениям, выполненным с использованием разных мтДНК-маркеров [9], митохондриальных и хромосомных маркеров (см., например [10]), обычно на небольшом наборе таксонов низшего ранга.

Множественно пытались проанализировать типы и источники неконгруентности в разных наборах данных по первичной структуре ДНК, преимуществам и недостаткам молекулярных подходов к филогении (см., например [11]). На этом пути поисков “розеттского камня” молекулярной филогенетики наталкиваются на предковый (анцестральный) полиморфизм признаков (незавершенность распределения аллелей или гаплотипов в линиях таксона к моменту наблюдения); неравные скорости мутирования разных маркеров и разных их частей; на неучитываемые и неизвест-

ные события гибридизации и интрогрессии линий и видов в эволюции; на возможность горизонтального переноса генетического материала. Это и внутри-, и межмолекулярные рекомбинации мтДНК, а также между мтДНК и яДНК (часто с последующей дубликацией участков ДНК), что приводит к паралолизации митохондриальных генов [7, 12–14]. Как полагают Брауер (Brower) и соавт. [11]: *“Теоретические обдумывание этой темы, даже в обманчиво-привлекательном математическом виде, не способствует нашему пониманию до тех пор, пока они не проверены реальными данными... Дальнейшие обобщения, выведенные из изоциренных филогений, обречены на свехупрощения, и возникает вопрос, можно ли вообще придти к каким-либо выводам, рассматривая генные деревья по более сложным таксонам в реальных условиях”*.

Получить же реальные, т.е. отвечающие неким объективным критериям, данные оказалось далеко не простой задачей. Помимо названных выше причин, недооценивается влияние биохимических и молекулярно-биологических аспектов проблемы при изучении *только последовательностей* ДНК как маркеров эволюции [15]. Баллард (Ballard) и Вайтлок (Whitlock) полагают [15], что фокус исследований с использованием митохондриальных маркеров должен сдвинуться в сторону биохимии и экологии, если вообще оставлять их как инструмент изучения истории популяций. Эти влияния зачастую не только не учитываются во всем их огромном разнообразии, но даже не обсуждаются при анализе филогенетических деревьев, хотя многие из них рассматривались или упоминались в обзорных работах разных лет, начиная 80-х годов и до сих пор [3, 7, 11, 16–19]. Особенно важно широко распространенное явление рекомбинации, которое означает отход от однопородительского и клонального наследования, что не позволяет делать однозначные выводы на основе митохондриального генома или его части [18].

ОБЩЕЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Таким образом, анализ даже некоторых публикаций как 90-х годов [20–27], так и последних лет [2, 15, 28–30] (см. также обзоры [31, 32]) приводит к пессимистической оценке и суммарных результатов, и перспектив использования только частичных последовательностей ДНК для понимания сложнейших и многомерных событий эволюции. *Простой и однозначной* взаимосвязи между генными деревьями, построенными на основании малых фрагментов мтДНК (и, по-видимому, других ДНК), и филогенией не прослеживается. Попытка выработать и сравнить тесты на степень неконгруентности деревьев, например, на возможность горизонтального переноса или событий дубликации, не привела к однозначным ре-

зультатам [33]. Тем не менее, данные по митохондриальным маркерам публикуются отдельно, несмотря на то что, как это видно на примере филогении ящериц *Psammodromus* Иберийского полуострова [34], они иногда прямо противоречат выводам [35], где результаты, полученные с использованием яДНК-маркеров, подвергают сомнению значение мтДНК-маркеров в изучении филогении этих лацертид.

На многочисленные противоречия в филогенетических выводах, основанных только на мтДНК [22, 35] или на мт- и яДНК (при изучении разных таксонов), указывают многие работы [36–39]. Согласно [39], различия в оценках числа и положений узлов при сравнении деревьев на основе тех и других маркеров достигают 30–70%. Рассмотрен относительный вклад гибридизации и незавершенной сортировки аллелей в линиях популяции (неполный линейный сортинг) [29, 31, 40–48], рекомбинаций в ДНК, межлинейной и межвидовой гибридизации [1, 49], паралолизации митохондриальных генов, зародышевой и другой гетероплазмии [50] в формирование филогенетических деревьев, а также географических и популяционных влияний [12], однако существенных сдвигов пока нет.

Трудности могут быть связаны с экстремальными изменениями климата и приспособленности организмов к местам обитания, что происходит очень часто – в пределах шкалы всего в сотни и тысячи лет [44]. Предполагается, что инструменты для сложных, основанных на моделях, выводов, которые могли бы надежно и однозначно использоваться эмпириками, пока не разработаны и ограничены, в том числе далеко недостаточным количеством и качеством программ. Следует отметить, что современное состояние науки, признающей сложнейшие взаимоотношения компонентов клетки, определяющие, в конечном счете, биоразнообразие [51], а также жизнедеятельность популяций, ставит под сомнение даже принципиальную возможность разработки программ, которые могли бы это состояние смоделировать.

В определенных условиях дерева, построенные на основании мтДНК-маркеров, отражают не филогенетические отношения, а другие процессы [46, 52]. В упомянутой работе [46] показано, что в случае ящериц семейства *Crotaphytidae* (*Crotaphytus* и *Gambelia*, плевродонтные игуаны) Сев. Америки произошло по крайней мере четыре эпизода интродукции и один очевидный случай неполного сортинга, что неизвестно или не учитывается в филогеографических построениях других таксонов. Далее, в нескольких работах по изучению комплекса ящериц сем. *Phrynosomatidae* – *Sceloporus* и *Phrynosoma* – представлено обзорное (для настоящего времени) использова-

ние современных филогенетических методов при осознании ограничений и недостатков, сопутствующих им. Имея проблемы неконгруентности деревьев, построенных по мт- и яДНК-маркерам, авторы привлекают хромосомный анализ (морфологический или экологические аспекты [48, 53]) в попытках разрешить противоречия [38]. Однако какого-то завершенного моделирования причин, окончательных выводов, более глубоких, чем определение современных клад и их более или менее вероятных филогенетических отношений, сделать не удастся. Упомянутые данные не согласуются с результатами работы, выполненной на том же таксоне (анализ см. [54]). Многие авторы, хотя и упоминают эти трудности [55, 56], не предлагают надежных оценок их значения. Попытки совместно проанализировать причины несоответствий и прийти к согласованному методу (или, по крайней мере, к согласованным методологическим подходам) их проверки [54, 57] пока не привели к обобщениям.

Таким образом, несмотря на интенсивную разработку проблемы [4, 58], пока не предложен единый методологический и статистический подход к сравнению обычно весьма дивергированных фрагментов ДНК. Нет общепринятых критериев выбора числа генов, наиболее информативной длины маркера, специфичности [59]. Трудно сравниваемые (выравниваемые) участки или индели или отбрасывают, или учитывают как единый признак, независимо от размера индели [49, 60–62]. В то же время, именно эти “неудобные” для плоского сравнения фрагменты могут быть отражением сложных рекомбинационных процессов и перестроек в хромосомах и митохондриях, которые могут иметь видообразовательное значение и служить филогенетическим сигналом [27, 60, 61].

Например, число повторов длиной 73–74 п.н. в контрольном регионе (CR) мтДНК морской и сухопутной черепах является родовым признаком, неучитывание которого при выравнивании обедняет филогению [13]. Возникают дискуссии по поводу возможности конкатенации (или, напротив, ее неправомерности) последовательностей разной специфичности в одном анализе [8, 63–67]. Предпринимались попытки смоделировать филогению, несмотря на незавершенный линейный сортинг [42, 68], которые, возможно, дают некоторую перспективу преодоления трудностей.

Нет согласия и по поводу того, исследовать ли большее число особей или большее число маркеров в большем или меньшем наборе проб [58]; по поводу методологии анализа данных и статистических тестов, как это, например, следует из критического рассмотрения и сравнения на одном наборе данных методов NJ, MP, ML и BMCMS и других [6, 21, 53, 57, 65, 69–78]; по поводу опреде-

ления вклада гибридизации или линейного сортирования в структуре генных деревьев [42, 79].

Число публикаций, в которых наблюдается хотя бы частичная конгруэнтность по разным методам анализа, невелико и, как правило, не сопровождается данными, которые свидетельствовали бы о поддержке дерева независимыми маркерами [80–82]. Помимо насыщения сайтов заменами при случайном мутировании, документированы случаи конвергентной молекулярной эволюции, например у змей и агамовых ящериц [83], что приводит к артефактному сближению этих таксонов на дереве.

Особенно резкая дискуссия возникла между автором распространенного метода NCPA (Nested Clade Phylogeny Analysis) [84, 85] и учеными, изучающими ход эволюции путем моделирования разнообразных условий и компонентов процесса и проверки их вероятности при помощи статистических тестов [79, 86, 87]. Метод NCPA подвергается критике [88]. До сих пор по поводу этой дискуссии нет заключений независимых экспертов, которые могли бы помочь неискушенным в математике и статистике биологам-экспериментаторам сделать адекватный выбор между методами анализа или их взаимодополняющими достоинствами (хотя такие попытки предпринимаются [84, 89, 90]), или предложить другие методы [91]. Исследователи часто применяют — одновременно и равновероятно — разные методы анализа (или только один из них) для оценки своих данных [21, 92].

Характерен совет, которому по умолчанию многие следуют до сих пор: *“Для перечисленных проблем мы рекомендуем эмпирический подход, в котором применяются различные методы при различных допущениях. Такой подход пытается обосновать утверждение, что эти проблемы изучаются эмпирически и можно случайно прийти к их решению”* ([21], с. 274).

Однако эта точка зрения достаточно лукава. Прочитав статью известных исследователей в области молекулярной филогении Гирибе (G. Giribet), Десалле (R. DeSalle) и Вилера (W. Wheeler), не потерявшую значение до сих пор: *“Если использовать три метода (MP, ML и NJ), возникает пять конкурирующих последствий: или все согласуются, или все не согласуются, или возникают варианты [MP + ML (NJ), MP + NJ (ML) и ML + NJ (MP)]. Кроме того, каждый из трех основных методов может давать некоторое число гипотез, зависящих от используемых параметров (модели). Если анализы неконгруэнтны, то обычно или выбирают тот результат, который более соответствует таксономическому подходу, или устанавливают критерии, которые отдадут предпочтение одной гипотезе над другой”* ([93], с. 141).

Другими словами, такая постановка вопроса не исключает априорного невольного предпочтения желаемого конечного результата, наиболее “нравящегося” авторам. Далее утверждалось [21], что основная надежда на этом пути — однонаправленность (ковариантность) изменений независимых признаков, что является более надежной детерминантой для выбора топологий, чем число этих признаков. Это, в общем допустимое предположение, все же не является панацеей, поскольку неясно, какое число признаков должно быть ковариантным, чтобы стать убедительным, или необходимо знать, какое их число допустимо для случайных совпадений в наборе признаков. Множество публикаций посвящено проблемам доказательности той или иной системы анализа данных. При обсуждении возможностей создания общей теории молекулярной систематики приводят более 10 различных методов и моделей, относительная ценность которых заключается скорее в том, что они представляют собой базу для разработки подходов к установлению видового дерева на основе генных, но абсолютная ценность которых остается пока неясной [31, 43, 94, 95]. Даже при наиболее оптимистичной оценке возможностей и перспектив молекулярной филогенетики Дельсук (Delsuc) и соавт. [96] вынуждены признать, что *“...получение сильно поддерживаемого дерева не обязательно свидетельствует о том, что оно правильно”* и *“...если метод неправильно трактует свойства данных, неправильное дерево может получить сильную статистическую поддержку”* ([96], с. 365).

В предлагаемом обзоре кратко рассмотрены основные причины, которые могут приводить к противоречиям и несоответствиям в трактовке результатов. Выделены также некоторые особенности молекулярной биологии ДНК и физиологии митохондрий и ядер, которые практически не учитываются, но могут быть причиной таких несоответствий. В качестве примеров используются, в основном, данные, полученные при изучении чешуйчатых рептилий, — не только потому, что это область интересов автора, но и потому, что этот таксон выходит в последние годы на лидирующие позиции (после человека и млекопитающих) как модельный объект, который представляется несколько менее сложным, чем рыбы, амфибии, птицы и беспозвоночные. Чешуйчатые рептилии в меньшей степени подвержены сезонным и среднемасштабным территориальным миграциям, границы обитания отдельных групп этого отряда более четко определены и более постоянны, что позволяет более строго изучать события гибридизации и линейного сортирования. Разнообразие условий обитания представителей этого таксона может быть оценено более объективно, а палеонтологии рептилий посвящены многочисленные публикации (хотя, по-видимо-

му, еще мало учитываемые). Все эти вопросы рассмотрены в обзорах [32, 97].

В то же время, на примере этого отряда особенно хорошо видны те противоречия, которые позволяют говорить о некоем критическом состоянии современной филогенетики. Цитируемые в обзоре работы, характеризующие состояние филогенетики в целом, выполнены в большой степени именно на рептилиях. Обобщение последних результатов изучения генома рептилий представлено в обзоре Янеса (Yanes) и соавт. [98].

Отряд чешуйчатых рептилий весьма разнообразен (около 4900 видов в примерно 26 семействах [99]), его таксономическое подразделение по морфологическим признакам несовершенно, мало согласуется, если вообще согласуется, с молекулярными данными и часто противоречиво [52, 69, 100–116].

По оценкам Камарго (Camargo) и соавт. [32] число публикаций по молекулярной филогении рептилий растет экспоненциально с начала 90-х и приближается к тысяче. Более чем в половине работ используются мтДНК-маркеры; в остальных – различные маркеры яДНК: микросателлиты (15–20%), аллозимы (около четверти), белковые гены (около 5%) и маркеры общей оценки яДНК типа RAPD/RFLP/AFLP (около 10%). До 2010 г. было исследовано 17 семейств ящериц и 117 родов, за последние два–три года это число значительно увеличилось.

Из таксонов семейства чешуйчатых основное внимание уделено ящерицам семейств Scincidae (более 130 родов), Agamidae (более 55 родов) и Lacertidae (более 30); в остальных семействах исследовано от 1 до 12 таксонов. В последнее время большое внимание уделяется змеям, у которых число крупных таксонов не менее 25–28 (около 2500–3000 видов) [117–121], и изучение их эволюции и положения внутри чешуйчатых также дает неоднозначные результаты [122, 123].

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК КАК МАРКЕР ЭВОЛЮЦИИ

Едва ли не все работы, в которых используют мтДНК-маркеры, начинаются с утверждения, что эти маркеры исключительно удобны и информативны, так как быстро эволюционируют, наследуются по материнской линии и не подвержены рекомбинации.

Эти утверждения, в ряде случаев, не имеют серьезных оснований и не учитывают возможности нераспознанного анцестрального полиморфизма, явлений паралогизации и рекомбинаций, разных скоростей эволюции мтДНК и ее участков в разных жизненных ситуациях, при том, что исключительность материнского наследования ча-

сто переоценивается [10, 124, 125]. И действительно, факты таковы, что во множестве случаев филогенетические деревья при сравнении отдельных генов мтДНК или при их конкатенации в одном анализе, при сравнении топологий, построенных на одном наборе видов с использованием различных митохондриальных и ядерных маркеров, неконгруентны [35]. Зачастую противоречивы и результаты обработки (NJ, MP, ML, BI) одного и того же набора данных разными методами (см. предыдущий раздел, а также [126–128]). Все это отмечалось уже на первых этапах использования митохондриальных маркеров в конце 80–90-х годов [26, 117, 129, 130] и многократно подчеркивается в более современных работах.

Первопричина этой неконгруентности – не учитываемые и часто неизвестные обстоятельства, которые могут определять и неравномерность, и несопоставимость скоростей мутирования разных митохондриальных маркеров, разных участков каждого из них в разных таксонах и полной мтДНК как таковой, которые подвергаются разнообразным влияниям. Некоторые из этих аспектов, по крайней мере, понятны и могут быть смоделированы – например, незавершенность распределения аллелей в линиях потомков (неполный линейный сортинг) или наличие ядерных паралогов митохондриальных генов [126]. Но, если это зависит от различий в интенсивности функционирования и диверсификации митохондрий в разных условиях – климатических, физиологических, популяционных [131]; от гетероплазмии (т.е. специфичности гаплотипов мтДНК в разных тканях одного организма); или особенностей размножения митохондрий в зародышевых и соматических клетках; или от иногда интенсивной и непредсказуемой внутри- и межмолекулярной рекомбинации мтДНК; или нераспознанной рекомбинации митохондриальной и ядерной ДНК, то степень мутирования мтДНК отражает собственную историю существования митохондрий, а не истинную эволюционную историю целого организма.

Если присовокупить сюда упомянутые во Введении трудности с трактовкой результатов с использованием разных методов, то положение становится еще более сложным [126, 127]. Далее мы рассмотрим некоторые проблемы, условно подразделив материал на подглавы, хотя все эти аспекты тесно взаимосвязаны и взаимообусловлены, и некоторые материалы могут свидетельствовать о нескольких аспектах одновременно.

Физиология митохондрий

Число митохондрий в разных соматических клетках существенно варьирует, так же как и число молекул мтДНК, число делений и спонтанных мутаций в каждой из них (см. обзоры [132, 133]).

Уровень вариабельности больше или меньше — в зависимости от древности таксона, а также и от интенсивности энергетической функции митохондрий в данных условиях, связанной с интенсивностью образования свободных радикалов кислорода, активных мутагенов. Если это так, то интенсивность энергетической функции должна непосредственно зависеть от степени и характера активности животного в той или иной среде обитания, и опосредовано — от относительного размера тела, пола, возраста, способа питания, температуры окружающей среды, стрессов и таких природных явлений, как геологические сдвиги, изменения климата и т.п. (см. обзоры [132, 134, 135], а также [131, 136]). У ящериц это проявляется, например, в том, что особи многих таксонов в активном состоянии имеют разную температуру тела. У представителей гекконовых и гимнофтальмид средняя температура тела составляет около 27°C, у лацертид и тейид — 35–36°C, у сцинковых — 35–37°C. Представители игуановых, живущие в открытых условиях, имеют температуру 26–28°C, в закрытых — 36–37°C, и это безусловно связано с энергопотреблением и опосредовано с вероятностью мутирования мтДНК [137].

При возрастании скорости генерации активных форм кислорода (АФК) или при снижении скорости их нейтрализации при смене условий общий уровень АФК может значительно повышаться; увеличивается степень окислительных модификаций всех макромолекул, в том числе ДНК. Интенсивность энергетического обмена и мутирования мтДНК зависит от множества ферментов, а любые генетические “поломки” на этом пути могут видоизменять характер и степень ее мутирования. Уровень АФК в митохондриях прямо зависит от активности ферментов, их разрушающих, в частности, от глутатионпероксидазы и каталазы. Известно, что даже единичные аминокислотные замены могут сильно менять активность этих белков и приводить к повышению уровня митогена (см. обзор [138]) и к увеличению риска заболеваний (рак, ишемия), чувствительности к стрессам и старению. Соматические мутации накапливаются с возрастом (показано на человеке), нарушают энергетический метаболизм, состояние которого отражает своего рода “возрастные часы” (см. обзор [139]).

Все эти параметры, очевидно, невероятно разнообразны, разнохарактерны, таксоно- и тканеспецифичны, зависят от возраста животного [15, 135]. Так скорость эволюции белковых генов мтДНК парнокопытных в 6–7 раз выше, чем у примитивных рыб, и в 3–8 раз — чем у рептилий (черепаха). Эта тенденция выявляется при сравнении эволюции рыб, амфибий, птиц, грызунов, парнокопытных, человека и китов (см. Adachi et al., 1993 в обзоре [132]). Мутации накапливают-

ся с возрастом, приводя в ряде случаев к соматическим патологиям, хотя наиболее вредоносные из них могут “отфильтровываться” при переходе через стадию зародышевых клеток, а более нейтральные наследуются (см. обзор [139]). Таким образом, обращение к биологии митохондрий, хотя и далеко не полно изученной, открывает такие ее аспекты, которые могут влиять на свойства и эволюцию мтДНК практически каждой линии филогенетического маркера [15, 132].

Наблюдается отчетливая тенденция зависимости между размерами тела и скоростью мутирования внутри одного таксона (см. обзор [132]). Например, у приматов скорости замен в “молчащих” положениях кодонов генов митохондриальных белков (а также интенсивность метаболизма и времена генерации) изменяются в ряду совиная мартышка—обезьяна—паук—макак—гibbon—орангутан—горилла—шимпанзе—человек. Скорости мутирования и метаболизма снижаются в 2 раза на краях ряда, при том, что времена генерации меньше в 2–7 раз (обзор [132], см. Martin a. Palumbi 1993). При изучении филогении на уровне крупнейших таксонов и между ними необходимо принимать во внимание, что в ряде случаев у отдаленных таксонов (например, приматов и насекомых) скорость эволюции мтДНК может быть сопоставимой, в то время как даже в двух линиях одного вида (например, у морского ежа) она может отличаться чуть ли не на порядок. В связи с этим интересно отметить, что один из видов африканского безногого сцинка из р. *Acontias*, вопреки таксономической логике, распадается на филогенетическом дереве на две группы; их единственное (видимое) различие — примерно двукратная разница в размерах [140]. То же характерно для другого вида этого рода, две рядом расположенные популяции которого в соответствии с размерами тела попадают в разные клады.

Примечательно, что, по-видимому, времена генерации у крупных отдаленных таксонов не коррелируют со скоростью эволюции мтДНК, поскольку у акул и приматов эти времена сходны, но скорости существенно различаются. Как упомянуто выше, интенсивность обмена мтДНК различается даже у родов (видов), постоянно обитающих на более холодных (затененных) или более теплых (освещенных) участках или, возможно, на разных высотах над уровнем моря. Имеются прямые указания, что глубокая молекулярная дивергенция двух субклад агамы *Diporyphora nobbi* связана с условиями их обитания, а не со специфическими биогеографическими барьерами [141].

К категории факторов, влияющих на гаплотипическое разнообразие мтДНК, относится неполное (неабсолютное) материнское (или отцовское — у ряда таксонов) наследование мтДНК. В

большинстве случаев механизм полового наследования мтДНК действительно предполагает удаление митохондрий одного из родителей при слиянии яйца и сперматозоида, но они могут сосуществовать и на разных стадиях эмбриогенеза. Вероятность рекомбинаций между материнской и отцовской ДНК (т.е. появление новых или измененных гаплотипов) зависит от времени удаления митохондрий другого пола, которое может происходить и до оплодотворения — в сперматозоиде, в гамете во время предмейоза и при мейозе, на первых стадиях дробления зиготы и при распределении клеток на отделы зачатков тканей [133, 142].

ДНК самца может исчезать существенно позже оплодотворения — иногда на стадии 48-часовых эмбрионов. В этом процессе участвует убиквитин, маркирующий структуры, подлежащие уничтожению. Любые сбои в этом процессе могут продлевать время сосуществования родительских митохондрий. Известны случаи, когда при гибридизации разных видов (например, домашней коровы и дикого быка) мтДНК отца обнаруживается даже в 80-недельных эмбрионах. Унаследованный от отца материал может передаваться по наследству, как показано у овец [143].

Практически неучитываемым, но не менее важным, остается влияние генетических изменений, приводящих при неполном материнском наследовании мтДНК к так называемым митохондриальным болезням. Например, описан казус массивной передачи отцовского делеционного гаплотипа гена *ND2* при миопатии человека [144]. Гаплотип отца с делецией 2 п.н. составляет около 90% “материнской” мтДНК, что приводит к повреждению одного из важных компонентов дыхательной цепи. Установлено, что в данном случае появляются множественные рекомбинанты отцовских и материнских участков ДНК [145].

Этот пример можно рассматривать как крайний случай, однако его принципиальная вероятность в животном мире делает неполное материнское наследование мтДНК источником ошибок при морфологическом, филогенетическом и популяционном анализе, если отцовская ДНК или обладает селективными преимуществами, или быстро распространяется в популяции.

В особых случаях (например, при размножении некоторых рептилий) самки могут спариваться с несколькими самцами, сперматозоиды которых могут переживать в половых путях самки и оплодотворять разные яйца ([120, 146] и ссылки в них). Механизм удаления отцовской мтДНК у рептилий не изучен, однако, не исключено, что разные линии одного или близких видов могут содержать рекомбинантные ДНК от разных отцов, а их несходство может уменьшать видимую степень родства. Филогенетические построения в

таких случаях вряд ли могут соответствовать действительной эволюции вида — необходимо знать, присутствует ли отцовская ДНК в ДНК самок.

Складывается впечатление, что в большинстве работ, выполненных с использованием мтДНК, даже не принимаются во внимание и, конечно, не тестируются основные предположения, влияющие на “нейтральность” эволюции: постоянна ли скорость мутирования, стационарно ли распределение частот аллелей, коррелирует ли уровень полиморфизма и дивергенций. Отсутствие таких тестов ограничивает возможность интерпретировать результаты и, что более важно, понять природу селекции, “работающей” в митохондриях [15]. Как утверждают авторы, при использовании митохондрий в качестве маркеров истории популяций необходимо учитывать зависимость их функционирования от экологии организма.

Гетероплазмия ДНК

Явление гетероплазмии мтДНК, понимаемое более узко как вариативность гаплотипов в разных тканях одного организма, возникает при сегрегации наиболее отличающихся материнских гаплотипов по разным тканям в эмбриогенезе [133]. Возможно, это связано с направленным отбором определенных гаплотипов в определенной ткани, в частности, более склонных к рекомбинации с яДНК и к образованию паралогов, как в клетках волосных луковиц, число паралогов у которых больше, чем в других тканях [147]. То же показано при прямой проверке амплификатов, полученных с митохондриальными праймерами на ДНК, выделенных из разных тканей [5].

Гетероплазмия может возникать не только за счет неполного материнского наследования, но и за счет рекомбинации между разными молекулами ДНК одной митохондрии (рассмотрено в работе Уоллиса (Wallis) [148]). Перетекание отцовской ДНК в ооцит обусловлено многими причинами общебиологического характера [40, 133]. Оно в разной степени выражено в разных таксонах — от практически полного отсутствия отцовского наследования у низших эукариот и некоторых растений, через существенный вклад, например у овец [143] и человека [144], значительный у дрозофилы и ряда других организмов, ничтожно малый — у гибридов лошади и пони ([143], см. Hitchinson et al., 1979) и гибридных мышей [149]. Фрагменты отцовской ДНК могут быть обнаружены не только внутри некодирующих районов, но и внутри кодирующей последовательности гена *COI* [143].

В итоге, в различные ткани, закладывающиеся на ранних стадиях эмбриогенеза, могут попадать разные варианты (гаплотипы) мтДНК, которая подвергается дополнительному стохастическому

мутированию при репликации в делящихся соматических клетках. Отцовская мтДНК может сохраниться в потомках, и это значит, что времена, определяемые по дивергенции только нерекombинированной ДНК, будут меньше, чем при учете рекомбинации, а таксон окажется на самом деле старше [150]. Вегетативная сегрегация зависит от числа органелл в клетке и от числа внутриклеточных репликаций, от интенсивности энергетического обмена на данном этапе развития и жизни особи, а также испытывает регуляторное воздействие со стороны хромосомного генома (см. обзор [50]). Практически все эти параметры и их соотношения остаются неизвестными в работах, использующих мтДНК-маркеры. И фактически все они тем или иным образом связаны с возможностью неабсолютной наследуемости мтДНК от одного из родителей и от неясных пока закономерностей тканеспецифического распределения гаплотипов. Тем не менее, при работе даже с одним набором организмов допускается сравнение препаратов ДНК, полученных из разных тканей разных особей [151, 152], без указания возраста особей и сопоставления размеров тела сравниваемых таксонов.

Этот вопрос чрезвычайно усложняется, когда на какой-либо стадии эволюции может происходить гибридизация (один из предполагаемых факторов неконгруентности филогенетических выводов [153]), а тем более неоднократные межвидовые или межвидовые скрещивания, когда мтДНК матери и отца могут стохастически распределяться по разным тканям потомка или рекомбинировать. Как уже упоминалось, при межвидовых скрещиваниях отцовская мтДНК встречается на более поздних стадиях эмбриогенеза, но только в зачатках некоторых тканей каждой особи, т.е. материнские и отцовские мтДНК могут сегрегировать при развитии в разные ткани, создавая базу для гетероплазмии ([133], см. Shitara et al., 1998).

Известно, что межпопуляционная и межвидовая гибридизация могут приводить к перестройкам хромосомного аппарата. Это, в свою очередь, может сказываться на степени гетероплазмии мтДНК, поскольку известно теснейшее взаимодействие и взаимовлияние мт- и яДНК в одной клетке (см. обзор [50]). Об этом свидетельствуют, например, различия в уровне гетероплазмии у диплоидных и триплоидных форм партеногенетического вида тейидных ящериц *Cnemidophorus tessellatus*, возникших в результате однократной или двукратной гибридизации *C. marmoratus* с самцами двух разных видов: у триплоидной формы уровень гетероплазмии чуть ли не в 3 раза больше. У диплоидных (исходных) двуполовых видов и диплоидных партеногенетиков степень гетероплазмии одинакова [154]; другими словами, доза ядерного материала влияет на интенсивность гетероплаз-

мии. О влиянии перестроек в яДНК на возникновение гетероплазмии в мтДНК свидетельствует ее высокий уровень у дрозофилы, у которой рекомбинационные явления происходят при передаче генетической информации через ядерные транспозоны, что рассматривается как фактор видообразования у этих насекомых (Евгеньев и соавт. 1998, см. ссылки в обзоре [51]).

Вероятными причинами возникновения полностью противоречащих друг другу (и, часто, “здоровому смыслу” географических предпосылок для возникновения более близкого или более далекого родства) филогенетических деревьев (например, у лацертидных ящериц р. *Acanthodactylus*) называют далекие события межлинейной и межтаксонной гибридизации, которые не поддаются контролю в настоящее время [155].

Таким образом, гетероплазмия может быть связана с явлениями, происходящими в самой митохондрии, и с рекомбинацией материнской и отцовской ДНК при оплодотворении с последующим неравновесным распределением мтДНК в клетках на ранних стадиях эмбриогенеза [142, 147, 156]. Гетероплазмия зависит от интенсивности накопления единичных мутаций или дупликаций (например, в генах тРНК) в разных молекулах ДНК (гаплотипирование) [157] и, очевидно, нарастает с возрастом [135]. У летучих мышей дивергенция митохондриального генома у одной особи имеет ту же амплитуду, что и между любыми двумя животными одной популяции и даже разных популяций [158]: 0–2.4% внутри особи, 0.6–2.3% между особями одной колонии, 0.6–3.4% двух колоний (из Германии и Португалии). Это соответствует порядку величин, найденных во многих работах, гетероплазмии в которых не проверяли. Как уже отмечалось, случайность или направленность генетического дрейфа в мтДНК тканеспецифичны и зависят от возраста особи [139, 156].

Гаплотипическое разнообразие мтДНК, обусловленное небольшим числом единичных мутаций в каждом гаплотипе, как полагают [147, 159], не опасно для достоверности деревьев по этим маркерам, если учитывать их все [153]. Следует отметить, что обычно при определении числа гаплотипов на основе последовательностей нескольких копий после клонирования получают заниженные значения, поскольку индивидуальное разнообразие митохондриальных генов, часто представленных многими тысячами на клетку, практически никогда не изучается достаточно подробно. Чтобы определить с 95%-ной достоверностью частоты гаплотипов во всей сумме геномов митохондрий необходимо секвенировать 125 клонов [159]. При меньшем числе можно опасаться, что реальный уровень “гаплотипии”, включая гетероплазмия, может быть существен-

но больше. В фундаментальном обзоре Функа (Funk) и Омланда (Omland) [160] приведены данные, согласно которым топология филогенетического дерева существенно зависит от числа гаплотипов, проанализированных в каждом таксоне.

Завершая этот раздел, нельзя не упомянуть результаты определения вариативности гаплотипов мтДНК в единичных митохондриях, метод выделения которых сейчас разработан. Одна митохондрия лейкозной клетки содержит две разные молекулы ДНК в соотношении примерно 50 : 50, что примерно соответствует соотношению гаплотипов в целой клетке. Неожиданным оказалось то, что примерно половина митохондрий вообще не содержит ДНК, 37% содержат одинаковые ДНК, а остальные — смесь молекул дикого типа и молекул с единичными заменами [161].

Неравномерность и ненейтральность процесса мутирования мтДНК

Исходные посылки при использовании мтДНК как по существу единого локуса предполагали ее мутирование по пути нейтральной эволюции, стохастической по своей природе и не подверженной положительному отбору. Эта посылка, допуская гипотезу молекулярных часов, оказалась неверной [15, 132, 136, 162–165], в том числе по результатам изучения ящериц рода *Anolis* острова Барбадос или других ящериц. Так использование калибровки по мтДНК агамид дает начало Тасманийской линии сцинков (маркер *ND2*) 12.7 млн. лет тому назад, а калибровка по пигоподидам (сумма маркеров *ND2* и *c-mos*) отодвигает срок до 35–40 млн. лет [166].

В целом, представления о соотношении дарвиновской и “недарвиновской” эволюции и непродуктивности гипотезы молекулярных часов рассмотрены Воронцовым [27]. Эта проблема тесно сцеплена с неодинаковостью скоростей мутирования разных регионов ДНК в разные периоды эволюции, характеризующиеся или гомеостазом и накоплением малозначащих для белка (нейтральных) мутаций, или ароморфозным (взрывным) характером, когда адаптивная цена мутаций резко возрастает. И поэтому “...гипотетическое родословное дерево эволюции одного белка не может совпадать с аналогичным деревом для другого белка, как не будут совпадать и расчеты времени, потребного для замещения аминокислоты в одной молекуле” ([27], с. 588). Если же принять точку зрения, что эволюция определяется далеко не только и не столько эволюцией белковых генов, где синонимичные замены в кодонах считаются нейтральными (но на самом деле могут иметь кардинальное значение при взаимодействии белкового продукта с лигандами и регуляторными белками в трехмерном пространстве), сколько организацией и мутированием некодирующих —

и преобладающих в геноме — последовательностей, то цена мутаций может оказаться совсем иной и гораздо более важной [51]. Однако эти общие соображения мало повлияли на широкое использование мтДНК в качестве маркера суммарной эволюции.

Тем не менее, как отмечалось уже в 90-е годы, эволюция мтДНК подчиняется направленному отбору, что характерно и для яДНК [24, 156, 162, 167, 168], и для мтДНК, в которой постоянно возникает большое число полиморфных замещений (replacement polymorphism) и имеется большое число специфических редких замен как в синонимичных, так и в несинонимичных сайтах [24, 131, 132, 160, 167, 169]. мтДНК подвергается и прямой и непрямой селекции, когда отбираются или сами последовательности, или сайты, косвенно влияющие на их функционирование [15]. Более того, функционирование и эволюция мт- и яДНК сцеплены, что неудивительно, поскольку энергетический обмен контролируется комплексами, в которые входят как ядерные (их подавляющее большинство), так и митохондриальные белки, а регуляторное влияние ядра несомненно [19].

Как уже отмечалось, скорости мутирования молекулы мтДНК и разных ее частей в разных таксонах различаются [17, 170]. Отличия в скоростях эволюции различных участков ДНК (для обозначения этого явления придуман термин “гетеротаксия” [76]), в частности мтДНК, создают основную (принципиальную) трудность на пути изучения эволюции [171]. Особенно хорошо это видно при сравнительном анализе трех полных мтДНК змей, для которых характерны специфические свойства и дупликация *CR*-участка. Все части генома эволюционируют с разными скоростями как внутри одной ДНК, так и в ДНК разных видов [172]. Предполагается, что селективное давление по-разному проявляется на разных уровнях функционирования мтДНК змей и на разных уровнях эволюции, что и приводит к особенно сильной (по сравнению с другими позвоночными) диверсификации мтДНК змей. Кроме насыщения сайтов заменами при случайном мутировании, что само по себе может исказить степень молекулярного родства, документированы случаи конвергентной эволюции некоторых митохондриальных белков, например у змей и агам [83], в результате которой происходит артефактное сближение этих таксонов на дереве. На эти обстоятельства внимание было обращено более 10 лет тому назад [119].

С той же проблемой, обусловленной существенными различиями в скоростях мутирования мтДНК разных таксонов рептилий, сталкиваются попытки “увидеть” общую филогению сквамат (см. [54] и ссылки в ней). В упомянутой работе также не удалось получить конгруэнтные резуль-

таты ни одним из использованных методов анализа, хотя в ряде случаев кладообразование воспроизводится на родовом и видовом уровнях. Авторы приходят к выводу, что “знание правильного дерева может быть вообще недостижимо” [54]. Так же осторожно приходится воспринимать попытки расширить набор таксонов за пределы рептилий при выравнивании всех доступных генов мтДНК. На таком дереве слепозмейки располагаются в основании рептилий, однако около половины последовательностей рептилий и других таксонов (от рыб до млекопитающих) оказываются несопоставимыми и отбрасываются [173], хотя именно они могут содержать важные филогенетические сигналы.

Разработана модель, предсказывающая и объясняющая гетерогенность скоростей мутирования мтДНК в разных условиях [105, 131]. Тенденция к обратной зависимости между молекулярной эволюцией и размером тела, возможно, есть общая тенденция молекулярной эволюции рептилий, которая наблюдается также у птиц и млекопитающих [105, 134]. Об отклонениях от нейтральности свидетельствуют оценки генетического полиморфизма в митохондриях организмов разных групп в зависимости от размера популяции [168]. При нейтральной эволюции интуитивно предполагается постулат популяционной генетики: полиморфизм ДНК должен быть пропорционален эффективному размеру популяции (т.е. числу поколений в единицу времени). Уменьшение степени дивергенции обычно рассматривают как уменьшение (или вымирание) популяции за счет изменения ее структуры, прохождения через бутылочное горлышко, изменения жизненного цикла или системы размножения при изменении условий среды. В мире животных размеры популяций существенно варьируют (на порядки величин), и можно ожидать, что многочисленные виды (например, беспозвоночных) окажутся в среднем более дивергированными, чем малочисленные ([168] и ссылки там).

Однако при изучении около 3000 видов позвоночных и беспозвоночных оказалось, что степени полиморфности мтДНК-маркеров не соотносятся с масштабами численности особей и с экологией таксона: дивергенция мтДНК у беспозвоночных не выше, чем у позвоночных, не различается у морских и сухопутных таксонов или у животных разного размера. Ядерные же маркеры, напротив, соответствуют ожиданиям в связи с эффективными размерами популяций. Возможны неоднократные и повторяющиеся циклы адаптивной эволюции митохондрий, поэтому полагают неуместным использовать мтДНК для изучения биоразнообразия и выработки политики сохранения редких видов [168].

В связи с этим встает вопрос и о смысле сравнения филогенетических отношений на основании единичных генов, в том числе и главным образом, митохондриальных, если представить все разнообразие влияний, оказываемых условиями жизни и жизнедеятельности разнообразных таксонов, даже у достаточно близких линий организмов. Так называемый “баркодинг” [174] таксонов по одному произвольно выбранному гену (в качестве такого универсального репера предложен митохондриальный ген *COXI*, кодирующий один из доменов цитохромоксидазы) представляется малосостоятельным.

NJ-деревья баркодинга, полученные для огромного набора таксонов семи фил животных (Arthropoda, Chordata, Echinodermata, Mollusca, Annelida, Nematoda, Platyhelminthes) и восьми фил насекомых (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, Plecoptera, Blattaria, Ephemeroptera) [174], не вызывают доверия. Во-первых, их структуры не сравниваются с другими деревьями по другим маркерам, а, во-вторых, вызывает недоумение филогения моллюсков, которые делятся на четыре отдельные клады и располагаются на дереве в разных положениях относительно других неродственных клад. Часть артропод, кроме тех, которые образуют молодую сестринскую группу с хордовыми, попадает в парафилетическое положение к моллюскам, ближе к основанию. Нематоды также парафилетичны в группах Rhabditoidea и Spiruridae, а представитель подкласса Ecnoplia оказывается в группе двусторчатых моллюсков. Алогичным выглядит дерево насекомых, образующих три парафилетичные клады Coleoptera, одна из которых (Polyphaga в сумме с Hymenoptera) оказывается сестринской по отношению к Lepidoptera. Вторая и третья клады парафилетичны друг другу, и одна из них относится к полифагам, образующим первую группу.

Баркодинг по единичному гену, как и по другим митохондриальным маркерам, дает некоторое понятие о кластеризации особей в низших таксонах, и каждый кластер объединяется некими особенностями эволюции исследуемого гена в каждом из них. Однако вряд ли эти сведения могут быть полезны для широких филогенетических обобщений в силу множества особенностей обмена и организации мтДНК в каждом кластере.

Приведем еще примеры. Два несколько отличающихся по нуклеотидной последовательности гена *COXI* динофлагеллат существуют в двух разных контекстах (разные пары фланкирующих последовательностей) [175]. Если такая ситуация не уникальна, то использование праймеров к внутренним частям гена в качестве маркеров (обычно исследуют 400–600 п.н. внутренней части из примерно 1500 п.н. полного гена), как в подавляю-

шем числе филогенетических работ, может приводить к ошибочным результатам [176]. Эта ситуация требует предварительного детального знания числа маркеров и их структуры на фоне полной структуры мтДНК.

Конечно, теоретически было бы важно найти единый маркер для всего живого (хотя это *a priori* крайне маловероятно), но нельзя не отметить, что произвольный и не обоснованный строго выбор какого-либо одного гена кажется неприемлемым и чреватым вероятностью гомоплазий. Например, при изучении лацерт р. *Podarcis* по митохондриальным генам *COXI* и *Cyt b* по отдельности и по их сумме получены три разных дерева, причем все они отличаются от морфологического [177]. Хотя все группы этого рода распадаются на четыре клады, дивергенция между ними доходит до 15%, что сопоставимо с величинами, получаемыми при сравнении разных родов (и даже семейств) в других группах ящериц, и не соответствует оценкам возраста таксона по коэффициентам, принятым для мтДНК. Очевидно, здесь играют роль неучитываемые факторы, обусловившие усиленную дивергенцию. Такие же неоднозначно трактуемые данные получены при изучении широкого спектра родов лацертид [103].

Кроме того, вероятность существования ядерных паралога гена баркодинга (и некоторых других, как будет показано далее) достаточно высока. Так установлено, что гены *COXI* и *Cyt b* определенно имеют паралога в яДНК птиц [7] и других организмов [159]. Явление разнохарактерно даже на уровне отдельных клеток. Показано, что CR-участок мтДНК отдельных волосатых луковичек человека имеет разное число паралога [147], а у млекопитающих и птиц это же показано на примере гена *Cyt b* (см. обзор [178]). Содержание ядерных паралога в крови птиц и рептилий, эритроциты которых имеют ядра, также больше, а их дивергенция выше. В ДНК из крови количество паралога может составлять половину амплифицированного материала, а из мышечной ткани – около 1% [7] (подробнее рассмотрено ниже).

Если иметь в виду, что все паралоги митохондриальных генов в яДНК подвергаются амплификации (см. обзор [160]), то их число может оказаться вполне значимым. Другие ограничения в использовании мтДНК упомянуты в работах [7, 178]. При этом следует помнить, что, как упоминалось во Введении [96], получение хорошо разрешенного и статистически поддерживаемого дерева не гарантирует его корректности.

Вернемся еще раз к наиболее часто используемому маркеру – единичному гену *Cyt b*. Продукт этого гена, имеющего длину 1100–1200 п.н., локализуется в мембране митохондрий. В исследованиях обычно используют фрагмент гена длиной 300–600 п.н. (см., например [110]). При разработ-

ке универсальных праймеров для этого гена (а также для CR-района и района 12S) установлено, что варибельность гена в разных тканях достигает 50% [179]. Различается степень мутирования участков гена *Cyt b*, кодирующих консервативные и лабильные области белка, локализирующиеся в мембране. Сравнение полных аминокислотных последовательностей этого фермента у млекопитающих разных отрядов показало, что наиболее консервативные его петли, выходящие на внешнюю сторону мембраны, содержат примерно 7% замен, на внутреннюю сторону мембраны – около 30%, а заключенные в мембрану – до 49% [170]. Очевидно, что использование для филогенетических изысканий лишь небольших фрагментов (или даже полного) гена, разные участки которого дивергируют с разной скоростью, может приводить к ошибочным результатам. Использование стандартных праймеров для разных таксонов не спасает положения, поскольку скорость эволюции “стандартных” участков гена может различаться в разных таксонах. Эти соображения касаются любых других генов мтДНК.

В случае мтДНК проявляется наиболее нежелательная и неконтролируемая сторона любых способов (и морфологических, и молекулярных) изучения филогенетики, а именно, возможность конвергенции, что мимикрирует происхождение таксонов от единого предка [180]. Изучение рептилий при конкатенации всех 13 белковых генов митохондрий и двух ядерных (*rag1* и *c-mos*) выявляет противоречащее некоторым работам положение семейства Agamidae как сестринское по отношению к змеям. Сами авторы [180] подвергают сомнению вытекающие из их работы выводы, полагая их результатом молекулярной конвергенции изучаемых генов.

Этот частный результат кажется тем более спорным, поскольку на основе той же группы маркеров показано [181], что монофилия акродонт и змей (с одной стороны) и сцинкоморф и плевродонт (с другой), указываемая деревом по сумме митохондриальных белков, зависит от того, использовался ли ксенопус в качестве внешней группы, а также и от числа видов каждого семейства, взятых в анализ. При этих условиях существенно различаются топологии деревьев, построенные отдельно по митохондриальным и ядерным маркерам. Филогения сквамат видоизменяется, если в рассмотрение не включена клада змей. Все варианты построения имеют высокие статистические поддержки хорошо разрешенных деревьев (см. эпиграф к обзору). Данные этих работ [180, 181] отличаются от всех цитированных выше и по положению группы ящериц Gekkota. Имеются и другие частные различия. Противоречия на пути изучения филогении сквамат (и положения змей по отношению к ящерицам) представлены недавно [99].

Таким образом, если единообразие не удастся достичь даже при использовании всех белковых генов митохондрий и каждого из них, то принцип описания вида и классификации по единичному гену, как бы ни хотелось сторонниками филогенетики, построенной по мтДНК-маркерам [182, 183], не кажется обоснованным, особенно в свете современных представлений и всеобщего принципа неравномерности скоростей мутирования ДНК в зависимости от биологических параметров данной группы таксонов.

Рекомбинация мтДНК

Выше рассмотрена возможность рекомбинации между отцовской и материнской мтДНК, что дезавуирует и второй из действующих мифов по поводу митохондриальных маркеров – об отсутствии рекомбинации как внутри самой молекулы, так и между молекулами из одной и разных митохондрий, а также между мт- и яДНК. Следствием рекомбинации может стать удлинение конечной филогенетической ветви, а время до самого близкого предка окажется меньше, чем у деревьев без включения рекомбинированных фрагментов [184–186]. Многочисленные работы, опубликованные с конца 80-х годов, указывают на важное значение этого явления, которое недооценивается в филогенетике. Внутренней рекомбинации подвержены мтДНК протистов, растений, грибов и высших эукариот. Рекомбинация выявлена примерно в 15% изученных 267 последовательностей позвоночных, ракообразных, моллюсков, нематод, иглокожих и аннелид, что отвергает идею полностью клонального наследования мтДНК [187]. То же характерно для приматов и других таксонов, включая рептилий [16, 18, 25, 133, 145, 188–190], в том числе акродонтных ящериц [191]. Митогеномы акродонт менее консервативны, чем игуановых, по возможности рекомбинаций и скорости эволюции. Наблюдается специфическая для ряда линий реорганизация, а также транслокация одного из генов тРНК с 5'- на 3'-половину генома.

Размеры молекулы мтДНК могут зависеть от присутствия повторов, например, в CR-области [188, 192, 193] или в некоторых белковых генах; может изменяться порядок расположения или происходить их дупликация [175], возможно, вследствие рекомбинации [187] или сбоя репликативного процесса. Результаты этих более ранних работ подтверждены неоднократно, например, при сравнении двух полных последовательностей мтДНК птиц-носорогов, которые отличаются двумя tandemными дупликациями, содержащими часть гена *Cyt b*, два гена тРНК, ген *NAD6* и оканчивающимися после района CR. Эти последовательности внутренне гетероплазмичны по числу повторов в доменах I и III района CR. Имеются так-

же индивидуальные различия в кодирующих районах. По-видимому, рекомбинации могут происходить часто, а именно, как полагают, в каждой генерации [194]. Об этом же свидетельствуют данные, показавшие, что около 13% митохондрий человека содержат гетероплазмическую смесь геномов дикого типа и мутантных, около 37% – полностью гомоплазмичны, остальные вообще не содержат мтДНК [161].

Такая внутренняя паралолизация делает необходимым определение полных структур всех сравниваемых мтДНК, чтобы знать, какому именно фрагменту наиболее соответствует структура вырожденного универсального праймера или конструировать праймеры, точно соответствующие этому фрагменту.

У нематоды найдено по три–четыре копии повторов длиной 100, 63 и 8 п.н. на митохондриальный геном, расположение которых может меняться, т.е. они могут рекомбинировать [25]. Полиморфизм и делеции выявлены в мтДНК при многих патологиях. Митохондрии содержат аппарат рекомбинации [25, 133, 139, 190]. Важным источником рекомбинированных молекул, как уже отмечалось, является межлинейная (межпопуляционная) и межвидовая гибридизация и интрогрессия, которую невозможно предсказать в начале исследования эволюции с использованием молекулярных маркеров, но можно определить по его результатам [195]. Определение филогенетики популяций по единичному локусу без предварительной оценки возможности гибридного происхождения некоего множества его гаплотипов становится бессмысленным.

Ядерные паралоги генов мтДНК (NUMT) как частный случай рекомбинации

Важность рекомбинации между митохондриальными генами и хромосомной ДНК (с образованием паралогов) для изучения филогении заслуживает отдельного рассмотрения. Это явление, зарегистрированное в ранних опытах по гибридизации, многократно наблюдалось на разных таксонах [7, 196–200]. Ядерная мембрана проницаема для митохондриальных продуктов, мтДНК и ее фрагментов [171]. Фрагменты встраиваются в двухцепочечные разрывы ДНК посредством негомологического соединения концов. Распространенность, механизмы встраивания и функциональная важность этого явления рассмотрены в обзоре [197].

Термин NUMT (Nuclear MT-DNA, произносится по-английски “new-mights”) введен для обозначения фрагментов мтДНК, встроенных в ядерный геном [201]. Описан один из наиболее поразительных случаев возникновения паралогов – в результате транспозиции большого куска мтДНК

(около 7.9. из 17 т.п.н. митохондриального генома) в геном домашних кошек. В этот NUMT входят гены *COII*, *ND4*, *12S* и *16S* рРНК, а также несколько генов тРНК. Интегрированный фрагмент многократно размножается внутри яДНК (от 39 до 76 раз) с образованием “монстра” длиной 300–600 т.п.н., который входит в состав двух хромосом, образуя множество аллелей. Степень дивергенции каждого гена NUMT от исходной копии составляет 6–10% у разных белковых генов и 0–3% — у рибосомных генов.

Один из NUMT у человека и шимпанзе содержит около 90% полной молекулы мтДНК [197, 198]. Эти и множество других примеров свидетельствуют как о принципиальной возможности рекомбинации практически любых по размеру фрагментов мтДНК с яДНК, так и о непредсказуемости последствий и масштабов этого явления [202]. В результате анализа 85 полных последовательностей ДНК животных установлено, что NUMT занимает от 0 до 0.25% генома (в большинстве случаев — от 0.001 до 0.1%), причем наблюдается тенденция к увеличению доли NUMT при увеличении размера генома [197, 198].

Изменение функциональной нагрузки в ядре неизбежно связано с изменением типичной для митохондриальных генов скорости и степени мутирования на ядерный тип мутирования и отбора. Другими словами, у паралога изменяются паттерны замен функционально отличающихся нуклеотидов: в результате различий в соотношении трансверсий и транзиций, размеров инделей, скорости превращения цитозина в тимин за счет более мощного аппарата метилирования в ядре ([17], а также обзор [196] см. Petrov a Hartl 1999; Bulmer 1986). Предполагается, что попадание митохондриальных генов в ядро приводит к его псевдогенизации, т.е. к потере первичной функции за счет возникновения дополнительных стоп-кодонов и различий в генетическом коде и составе тРНК в митохондриях и ядрах. Аутентичность филогенетически митохондриальных генов, если и оценивается, то именно по этим признакам.

Однако на самом деле ситуация гораздо сложнее и выходит за пределы этих оценок.

Во-первых, степень псевдогенизации митохондриальных генов в ядре зависит от времени их переноса. Видимо, поэтому степень различий между митохондриальными генами и ядерными паралогами в разных случаях и разных таксонах может составлять от 0.5 до 25–30%, как указано выше [197, 198, 202]. ПЦР-праймеры, которые амплифицируют CR-район на мтДНК из крови слонов, на ДНК из волос этих же животных амплифицируют преимущественно ядерную копию митохондриального гена [203]. Известно, что около 85% замен в NUMT синонимичны, т.е. псевдогенизация с потерей функции и появи-

ем стоп-кодонов в 5–6 раз менее вероятна, чем псевдогенизация по незначимым кодомам [171]. Поэтому, если перенос произошел относительно недавно, без повреждения стоп-кодонов, то считывание NUMT с помощью обычных универсальных праймеров может приводить к их ошибочному узнаванию как митохондриальных генов.

Известны случаи, когда артефактные для целей филогении NUMT считываются даже лучше митохондриальных, поскольку вырожденность праймеров, разработанных по усредненным (вырожденным) для нескольких таксонов последовательностям ([7], см. Collura a. Stuart, 1995), может оказаться более благоприятной для NUMT, чем для самого митохондриального гена. Нередки случаи, когда считывание с несколько отличающихся (сдвинутых по последовательности) праймеров к одному и тому же участку гена дает продукт, содержащий даже замены нескольких кодонов [7]. Как упоминалось, в ряде случаев (птицы) NUMT-последовательности в продуктах амплификации с митохондриальными праймерами могут составлять половину всего материала [7, 196, 204, 205]. По-видимому, эти события транспозиции происходили многократно и происходят в наше время [200].

Особенно неблагоприятно то, что, как уже упоминалось, в ядре находят паралоги наиболее часто используемых в филогенетике митохондриальных генов, например, *COII* насекомых [199] и *COI* птиц [7]. Число их у насекомых велико, а разница между геном и псевдогеном составляет 1.0–2.6% (у особой популяции), ~2.1–2.4% — между популяциями, т.е. внутри порядка величин, которые часто считаются значимыми при сравнении видов в филогенетическом дереве. Очевидно вследствие такого совпадения. Делается вывод [197], что без четкого знания числа и сходства ядерных паралога мтДНК-маркеров баркодинг нереалистичен. Так, применение баркодинга к артроподам дает завышенное число видов, если коамплифицируются паралоги.

Во-вторых, иногда митохондриальный ген теряет функцию и передает ее своему ядерному паралогу, который не псевдогенезируется. Например, у кенгуровых функция гена лизил-тРНК, не работающего в самой митохондрии, перенесена в ядро, где и синтезируется продукт, транспортируемый затем в митохондрию [206]. У хламидомонады в ядро перенесена копия гена *ATP6*, кодирующего субъединицу 6 АТФ-синтазы F₀, которая у большинства организмов синтезируется в митохондриях. Продукт этого гена транспортируется в митохондрию, а сам ген становится как бы вторичным псевдогеном [207]. В этом случае считывание “обратного” паралога в митохондрии может исказить филогению на его основе.

Уровни образования NUMT у других организмов выглядят более скромными по сравнению с кошачьими, но они найдены чуть ли не у 90% исследованных таксонов (82 из 90) всех групп организмов [197]. У человека вначале обнаружили 354 NUMT [200], сейчас найдено еще более 100, их суммарная длина приближается к 300000 т.п.н. [197]. Многие NUMT включены в интроны, по крайней мере, один — в экзон гена-супрессора опухолевого роста, что не исключает видообразовательного или адаптивного значения паралогов. В ДНК мыши число паралогов примерно в 3 раза больше, чем у крысы, два вида *Schizosaccharomyces* отличаются по этому признаку в 10 раз, два вида нематоды — в 70, четыре вида дрозофилы — в 3–7 раз, кукуруза и рис — примерно в 15. Другими словами, вероятность “попадания” на паралог при филогенетическом сравнении даже близкородственных линий соответствует приведенным соотношениям. Степень гомологии разных псевдогенов с мтДНК может очень сильно варьировать — от практически полного сходства до еле уловимого. Это свидетельствует о перманентности процесса псевдогенизации. Большинство высокогомологических фрагментов имеет большие размеры, т.е. они более молоды и не “размыты” временем [197, 200].

Таким образом, необходимо определять точное число и структуру паралогов по полным структурам геномов или доказывать их отсутствие, выделяя мтДНК из хорошо очищенной фракции митохондрий.

В-третьих, число NUMT в различных тканях и клетках одной особи также может варьировать. Например, уже упомянутая ДНК из волосяных луковиц слона содержит существенно больше NUMT, чем ДНК из крови той же особи [203]. Поскольку исследователи практически не обращают внимания на использование ДНК из одной и той же ткани при сравнении таксонов, возрастает вероятность изучения несравнимых последовательностей.

В-четвертых, гены NUMT, попадающие в ядерный геном на разных этапах эволюции, содержат разное число замен, но *a priori* знать, NUMT какого возраста попадает в анализ, невозможно. Более древние будут искажать времена дивергенции в сторону переоценки.

Там не менее, явление паралогизации и сравнение паралогов может быть использовано при изучении внутри- или межвидовых отношений и демографических событий. Так, на примере двух полностью аллопатрических сейчас популяций (L3 и L5) иберийских лацертид *Lacerta lepida* показано, что из четырех паралогов гена *Cyt b* в геноме L3 два сходны с мтДНК L5, но совершенно отличны от L3, где они находятся. Эти NUMT отделились от генома L5 и включились в L3 при

гибридизации во время вторичного контакта, когда он возникал, что позволяет представить себе историю расселения популяций на полуострове [208].

В убедительно документированной работе Поднар (Podnar) и соавт. [209] с использованием длинных участков, содержащих несколько митохондриальных генов, и ДНК очищенных митохондрий в ядДНК степной ящерицы *L. sicula* обнаружено два вида NUMT, отличающихся существенно (примерно на 14%) от собственной мтДНК этого вида, но незначительно — от соответствующих участков мтДНК другого вида Аппенин — *L. muralis* (примерно на 3%). Интересно, что этот вид не имеет собственных паралогов, поэтому возникает предположение о неординарной возможности передачи участков мтДНК одного вида прямо в ядро другого — при гибридизации или путем горизонтального переноса. В качестве вероятных переносчиков рассматриваются вирусы сквамат или другие паразиты, например, клещи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрение множества работ, посвященных исследованию одного крупного таксона (отр. Squamata), приводит к неутешительному выводу, к которому приходят и авторы, изучающие другие таксоны, а именно, что мтДНК и, тем более, ее фрагменты не могут служить маркерами эволюционного пути таксонов. На уровне самых крупных таксонов и при попытках сравнения филогении разных отделов эукариот это невозможно, поскольку скорости мутирования мтДНК разных таксонов несопоставимы и разновелики. Эти различия приводят к искажению топологии дерева за счет эффекта притяжения длинных ветвей, а также потому, что в процессе эволюции возможны повторные раунды ускорения и замедления мутирования, практически не поддающиеся контролю и учету. Такого типа эволюционные изменения предсказал и описал еще А.Н. Северцов, который назвал их ароморфозами и идиоадаптациями, а позднее Н. Эдридж и С. Гулд (см. [27]). Не всегда можно точно определить на каком этапе мутационного процесса (стабильном или ускоренном) находится изучаемый современный таксон, хотя в ряде случаев факты конгруэнтности митохондриальных деревьев по разным маркерам и между митохондриальными и ядерными деревьями свидетельствуют как раз о том, что таксон находится на стабильной стадии существования, в условиях коадаптации мт- и ядДНК [19]. Эффект многократного насыщения мутациями в эволюции учесть и смоделировать практически невозможно.

На уровне низших таксонов — родовом и видовом — использование мтДНК дает представление только о кластеризации популяций, а степень их родства и эволюционная вертикаль остаются со-

мнительными. Незавершенная линейная сортировка гаплотипов, не учитываемые эпизоды рекомбинации внутри мтДНК и между нею и яДНК, физиологическая гетероплазмия мтДНК, не принимаемые в расчет различия в условиях обитания (температура, освещенность, влажность, давление, тип кормления, стрессы и т.п.), — все эти обстоятельства делают информативность таких деревьев весьма условной.

Положение не спасают попытки увязать известные географические и геологические панорамы обитания и наиболее вероятные пути расселения таксонов из ареала возникновения, поскольку здесь неизвестна (или непонятна) динамика изменений этих биогеографических показателей, “пульсации” ареалов, например, при многократных климатических флуктуациях.

В особых случаях, когда можно более уверенно опереться на геологические или палеонтологические сведения (например, у островных популяций ящериц р. *Tropidurus*), можно наблюдать примерное соответствие топологий деревьев, полученных разными методами, но и здесь их полная конгруентность — по разрешенности ветвей (политомий), длине ветвей, положению сестринских групп — видна далеко не всегда [12, 124, 210]. Кроме того, при сравнении разнообразия гаплотипов популяций ящерицы *Mabuia maculilabris*, обитающей на островах с известной геологической историей, оказалось, что вариабельность популяций на островах Тенерифе (11 млн. лет) существенно больше, чем на островах Сан-Томе (15 млн. лет) [211], что ставит под сомнение достоверность филогенетического дерева. Достоверна лишь кластеризация групп на деревьях, которую можно установить на основе гаплотипического анализа в наборе таксонов [212]. Еще более она вероятна, если поддержана ядерными маркерами, как это показано на примере ящериц-круглоголовок р. *Phrynocephalus* (Agamidae) [10]. Выявляемая в последнем случае филогения также неоднозначна, поскольку неизвестно, что происходило на самом деле: однократное расселение популяций из одного наиболее древнего ареала; дву- или многократные передвижения популяций по тем же путям; расселение из разных ареалов.

Соответствует ожиданиям (или, по крайней мере, не противоречит им) филогения пяти видов р. *Podarcis* Балканского полуострова, Пелопоннеса и Эгейского архипелага [213]. Однако следует отметить, что детали топологий могут измениться либо при увеличении числа мтДНК-маркеров, либо при увеличении числа сравниваемых таксонов одного ранга (сравним деревья, приведенные в работах по изучению варановых бассейна Индийского океана [59, 102, 157]). Достоверно регистрируется кладообразование по сумме мтДНК-маркеров в группе из трех видов р. *Psammotromus*

(лацертиды) Пиренейского полуострова и Сев. Африки, однако вызывает удивление тот факт, что восточная линия *P. algirus* в Испании образует сестринскую группу со смешанной группой, состоящей из юго-западной линии того же вида из африканской популяции и двух других видов [34].

Из общих соображений можно предположить, что случаи непротиворечивых реконструкций определяются вероятностью нахождения данного таксона в данном месте в состоянии длительной идиоадаптации (гомеостаза), в достижении полного сортинга гаплотипов и отбора на устойчивые и полезные варианты ДНК, в условиях полной репродуктивной изоляции. Соответственно, неконгруентность филогений по разным участкам связана с быстрой эволюцией таксона (например, стадия сальтационного видообразования) и с неполной адаптацией к условиям среды. Кроме того, рассмотрение закономерностей построения филогений практически не учитывает огромную и важнейшую область изучения хромосомных перестроек, как полагают, предшествующих видообразованию (см. [27]), и, как показано в работах лаборатории ее автора, способствующих формированию скрытых видов: “Эти перестройки могут влиять на топологию генных деревьев и объяснять, в ряде случаев, неконгруентность морфологических и молекулярных данных”. Другими словами, при построении двумерных деревьев по последовательностям ДНК не учитываются крупные трехмерные перестройки генетического материала, важные для реального видообразования. Эта точка зрения смыкается с современными представлениями о трехмерном пространстве функционирования и регуляции всех биохимических и молекулярно-биологических реакций, которые пока не учитываются при изучении путей формообразования, и для которых одномерная структура генетического материала может не иметь определяющего значения [51].

Кажется очевидным, что повальное увлечение мтДНК-маркерами должно завершиться, оставив за ними лишь частные вопросы, — при строгом контроле и учете индивидуальных отличий мтДНК и ее фрагментов внутри одной особи, между особями одной популяции (гаплотипия, гетероплазмия, ядерная паралогизация) и в разных тканях организма. Возможно, изучение должно быть ограничено только мтДНК репродуктивных тканей, что позволит исключить влияние внешней среды на интенсивность функционирования и размножения (т.е. степень мутирования) соматических митохондрий в разных тканях.

Приношу глубокую благодарность Е.А. Ляпуновой, А.М. Оловникову, А.А. Банниковой и Е.Ю. Дмитриевой за прочтение рукописи и цен-

ные замечания, а также О.Г. Скуридиной – за помощь при составлении списка литературы.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-00325) и программы “Генофонд и генетическое разнообразие” Российской академии наук (2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moore W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*. **49**, 718–726.
- Wiens J.J., Penkrot T.A. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Syst. Biol.* **51**, 69–91.
- Гречко В.В. 2002. Молекулярные маркеры в филогении и систематике. *Генетика*. **38**, 1013–1033.
- Engstrom T.M., Schaffer H.B., McCord W.P. 2004. Multiple data set, high homoplasy, and the phylogeny of softshell turtles (Testudines: Trionychidae). *Syst. Biol.* **53**, 693–710.
- McCracken K.G., Sorenson M.D. 2005. Is homology or lineage sorting the source of incongruent mtDNA and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (*Nomonyx-Oxyura*)? *Syst. Biol.* **54**, 35–55.
- Skinner A., Donnellan S.C., Hutchinson M.N., Hutchinson R.G. 2005. A phylogenetic analysis of *Pseudonaja* (Hydrophiinae, Elapidae, Serpentes) based on mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **37**, 558–571.
- Sorenson M.D., Quinn T.W. 1998. Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *The Auk*. **115**, 214–221.
- Weisrock D.W., Smith S.D., Chan L.M., Biebow K., Kappeler P.M., Yoder A.D. 2012. Concatenation and concordance in the reconstruction of the mouse lemur phylogeny: an empirical demonstration of the effect of allele sampling in phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* doi:10.1093/molbev/mss008.
- Greaves S.N.J., Chapple D.G., Gleeson D.M., Daugherty C.H., Ritchie P.A. 2007. Phylogeography of the spotted skink (*Oligosoma lineocellatum*) and green skink (*O. chloronoton*) species complex (Lacertilia: Scincidae) in New Zealand reveals pre-Pleistocene divergence. *Mol. Phyl. Evol.* **45**, 729–739.
- Соловьева Е.Н., Поярко Н.А., Дунаев Е.А., Банникова А.А. 2011. Молекулярная дифференциация и систематика надвидового комплекса такырной круглоголовки *Phrynocephalus* superspecies *helioscopus* (Pallas, 1771) (Reptilia: Agamidae). *Генетика*. **47**, 952–967.
- Brower A.V.Z., DeSalle R., Vogler A. 1996. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**, 423–450.
- Losos J.B., Jackman T.R., Larson A., de Queiroz K., Rodrigues-Shettino L. 1998. Contingency and determinism in replicated adaptive radiations of Island lizards. *Sci.* **279**, 2115–2118.
- Hanley T.C., Saccone A. 2005. Development of primers to characterize the mitochondrial control region of Galapagos land and marine iguanas (*Conolophus* and *Amblyrhynchus*). *Mol. Ecol. Notes*. **5**, 599–601.
- Kurabayashi A., Sumida M., Yonekawa H., Glaw F., Hasegawa M. 2008. Phylogeny, recombination, and mechanisms of stepwise mitochondrial genome reorganization in mantelliid frogs from Madagascar. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 874–891.
- Ballard J.W.O., Whitlock M.C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* **13**, 729–744.
- Moritz C., Brown W.M. 1987. Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: variation in incidence and gene content among lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**, 7183–7187.
- Brown W.M., Prager E.M., Wang A., Wilson A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* **18**, 225–239.
- Tsaousis A.D., Martin D.P., Ladoukakis E.D., Posada D., Zouros E. 2005. Widespread recombination in published animal mtDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 925–933.
- Castellana S., Vicario S., Saccone C. 2011. Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. *Genome Biol. Evol.* **3**, 1067–1079.
- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. 1987. Evolution of the animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**, 269–292.
- Crother B.I., Presh W. 1994. Xantusiid lizards, concern for analysis, and the search for a best estimate of phylogeny: further comments. *Mol. Phyl. Evol.* **3**, 272–275.
- Hedges S.B., Bazy R.L. 1994. Reply: Xantusiid lizards and phylogenetic inference. *Mol. Phyl. Evol.* **3**, 275–278.
- Palumbi S.R., Baker C.S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 426–435.
- Ballard J.W., Kreitman M. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends Ecol. Evol.* **10**, 485–489.
- Lunt D.H., Hymen B.C. 1997. Animal mitochondrial DNA recombination. *Nature*. **387**, 247.
- Cuore J.P., Kocher T.D. 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends Ecol. Evol.* **14**, 394–308.
- Воронцов Н.Н. 1999. *Развитие эволюционных идей в биологии*. М.: Издат. отдел УНЦ ДО МГУ, Прогресс-Традиция, АБФ, 640 С.
- Ballard J.W.O., Chernoff B., James A.C. 2002. Divergence of mitochondrial DNA is not corroborated by nuclear DNA, morphology, or behaviour in *Drosophila simulans*. *Evolution*. **56**, 527–545.
- Zink R.M., Barrowclough G.F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* **17**, 2107–2121.
- Shoo L.P., Rose R., Doughty P., Austin J.J., Melville J. 2008. Diversification patterns of pebble-mimic drag-

- ons are consistent with historical disruption of important habitat corridors in arid Australia. *Mol. Phyl. Evol.* **48**, 528–542.
31. Edwards S.V. 2009. Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution*. **63**, 1–19.
 32. Camargo A., Sinervo B., Sites J.W., jr. 2010. Lizards as a model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Mol. Ecol.* **19**, 3250–3270.
 33. Planet P.J. 2006. Tree disagreement: measuring and testic incongruence in phylogenies. *J. Biomed. Informatics*. **39**, 86–102.
 34. Verdúe-Ricoy J., Carranza S., Salvator A., Busack S.D., Diaz J.A. 2010. Phylogeography of *Psammodromus algirus* (Lacertidae) revisited: systematic implications. *Amphibia-Reptilia*. **31**, 576–582.
 35. Godinho R., Crespo E.G., Ferrand N. 2008. The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in the highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. *Mol. Ecol.* **17**, 4670–4683.
 36. Dolman G., Moritz C. 2006. A multilocus perspective on refugial isolation and divergence in reinfest skinks (*Carlia*). *Evolution*. **60**, 573–582.
 37. Sequiera F., Alexandrino J., Wess S., Ferrand N. 2008. Documenting the advantage and limitations of different classes of molecular markers in a well-established phylogeographic context: lessons from the Iberian endemic golden-stripped salamander, *Chioglossa lusitana* (Caudata: Salamandridae). *Biol. J. Linn. Soc.* **95**, 371–387.
 38. Leache A.D. 2010. Species tree for spiny lizards (genus *Sceloporus*): identifying points of concordance and conflict between nuclear and mitochondrial data. *Mol. Phyl. Evol.* **54**, 162–171.
 39. Fisher-Reid M.C., Wiens J.J. 2011. What are the consequences of combining nuclear and mitochondrial data for phylogenetic analysis? Lessons from *Plethodon* salamanders and 13 other vertebrate clades. *BMC Evol. Biol.* **11**, 300–320.
 40. Korpelainen H. 2004. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. *Naturwissenschaften*. **91**, 505–518.
 41. Degnan J.H., Rosenberg N.A. 2006. Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genetics*. **2**, e68.
 42. Holland B.R., Benthin S., Lockart P.J., Moulton V., Huber K.T. 2008. Using supernetworks to distinguish hybridization from lineage-sorting. *BMC Evol. Biol.* **8**, 202–213.
 43. Degnan J.H., Rosenberg N.A. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 332–340.
 44. Hickerson M.J., Carstens B.C., Cavender-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F., Yoder A.D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phyl. Evol.* **54**, 291–301.
 45. Pollard D.A., Iyer V.N., Moses A.M., Eisen M.B. 2006. Widespread discordance of gene trees with species tree in *Drosophila*: evidence for incomplete lineage sorting. *PLoS Genetics*. **2**, e173.
 46. MacGuire J.A., Linkem C.W., Koo M.S., Hutchinson D.W., Lappin A.K., Orange D.I., Lemos-Espinal J., Riddle B.R., Jaeger J.R. 2007. Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution*. **61**, 2879–2897.
 47. Knowless L.L., Carstens B.C. 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst. Biol.* **56**, 887–895.
 48. Leache A.D., Koo M.S., Spencer C.L., Papenfuss T.J., Fischer R.N. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the cost horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 12418–12423.
 49. Benavides E., Baum R., McClellan D., Sites J.W., Jr. 2007. Molecular phylogenetics of the lizard genus *Microlophus* (Squamata: Tropiduridae): aligning and retrieving indel signals from nuclear introns. *Syst. Biol.* **56**, 776–797.
 50. Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr. Genet.* **50**, 149–159.
 51. Гречко В.В. 2011. Повторы ДНК как инструмент биологического разнообразия. *Молекуляр. биология*. **45**, 765–792.
 52. Leache A.D., McGuire J.A. 2006. Phylogenetic relationships of horned lizards (*Phrynosoma*) based on nuclear and mitochondrial data: evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Mol. Phyl. Evol.* **39**, 628–644.
 53. Leache A.D., Reeder T.W. 2002. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulates*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Syst Biol.* **51**, 44–68.
 54. Douglas D.A., Arnason U. 2009. Examining the utility of categorical models and alleviating artifacts in phylogenetic reconstruction of the Squamata (Reptilia). *Mol. Phyl. Evol.* **52**, 784–796.
 55. Lindell J., Mendez-de la Cruz F.R., Murphy R.W. 2005. Deep genealogical history without population differentiation: discordance between mtDNA and allozyme divergence in the zebra-tailed lizard (*Gallisaurus draconoides*). *Mol. Phyl. Evol.* **36**, 682–694.
 56. Rowlings L.H., Rabosky D.L., Donnellan S.C., Hutchinson M.N. 2008. Python phylogenetics: inference from morphology and mitochondrial DNA. *Biol. J. Linn. Soc.* **93**, 603–619.
 57. Honda M., Ota H., Murphy R.W., Hikida T. 2006. Phylogeny and biogeography of water skinks of the genus *Tropidophorus* (Reptilia: Scincidae): a molecular approach. *Zool. Scripta*. **35**, 85–95.
 58. Yang Z., Rannala B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 9264–9269.
 59. Russo C.A.M., Takezaki N., Nei M. 1996. Efficiency of different genes and the different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol Biol. Evol.* **13**, 525–536.
 60. Giribet G., Wheeler W.C. 1999. On gaps. *Mol. Phyl. Evol.* **13**, 132–143.

61. Simmons M.P., Ochoterena H. 2000. Gaps as character in sequence-based phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **49**, 369–381.
62. Micloush I., Lunter G.A., Holmes I. 2004. A “long indel” model for evolutionary sequence alignment. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 529–540.
63. Ashton K.G., de Queiroz A. 2001. Molecular systematics of the western rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with comments on the utility of the D-loop in the phylogenetic studies of snakes. *Mol. Phyl. Evol.* **21**, 176–189.
64. Gatesy J., Baker R.H. 2005. Hidden likelihood support in genomics data: can forty-five wrongs make a right? *Syst Biol.* **54**, 483–492.
65. Gadagkar S.R., Rosenberg M.S., Kumar S. 2005. Inferring species phylogenies from multiple genes: concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. **304B**, 64–74.
66. Kubatko L.S., Degnan J.H. 2007. Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Syst. Biol.* **56**, 17–24.
67. Liu L., Pearl D.K., Brumfield R.T., Edwards S.V. 2008. Estimating species trees using multiple-allele DNA sequence data. *Evolution*. **62**, 2080–2091.
68. Maddison W.P., Knowles L.L. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Syst. Biol.* **55**, 21–30.
69. Keogh I.S., Edwards D.L., Fisher R.N., Harlow P.S. 2008. Molecular and morphological analysis of the critically endangered Fijian iguanas reveals cryptic diversity and a complex biogeographic history. *Phil. Trans. R. Soc. B*. doi: 10.1098/rstb.2008.0120.
70. Wiens J.J., Hollingsworth B.D. 2000. War of the iguanas: conflicting molecular and morphological phylogenies and long-branch attraction in iguanid lizards. *Syst. Biol.* **49**, 143–159.
71. Oliviero M., Bolgna M.A., Mariottini P. 2000. Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830, and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *J. Biogeogr.* **27**, 1403–1420.
72. Slowinsky J.B. 2001. Molecular polytomies. *Mol. Phyl. Evol.* **18**, 114–120.
73. Suzuki Y., Glazko G.V., Nei M. 2002. Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 16138–16143.
74. Townsend T., Larson A. 2002. Molecular phylogenetics and mitochondrial genomic evolution in the Chamaeleonidae (Reptilia, Squamata). *Mol. Phyl. Evol.* **23**, 22–36.
75. Jennings W.B., Pianka E.R., Donnellan S. 2003. Systematics of the lizard family Pygopodidae with implications for the diversification of Australian temperate biota. *Syst. Biol.* **52**, 757–780.
76. Kolaczkowski B., Thornton J.W. 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature*. **431**, 980–984.
77. Castoe T.A., Parkinson C.L. 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phyl. Evol.* **39**, 91–110.
78. Melvill J., Ritchie E.G., Chapple S.N.J., Glor R.E., Schulte J.A. II. 2011. Evolutionary origins and diversification of dragon lizards in Australia’s tropical savannas. *Mol. Phyl. Evol.* **58**, 257–270.
79. Petit R.J., Excoffier L. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 386–395.
80. Zamudio K.R., Jones K.B., Ward R.H. 1997. Molecular systematics of short-horned lizards: biogeography and taxonomy of a widespread species complex. *Syst. Biol.* **46**, 284–305.
81. Pang J., Wang Y., Zhong Y., Hoelzer A.R., Papenfuss T.J., Zeng X., Ananjeva N.B., Zhang Y. 2003. A phylogeny of Chinese species in the genus *Phrynocephalus* (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **27**, 398–409.
82. Melvill J., Hale J., Mantziou G., Ananjeva N.B., Minto K. 2009. Historical biogeography, phylogenetic relationships and intraspecific diversity of agamid lizards in the Central Asian deserts of Kazakhstan and Uzbekistan. *Mol. Phyl. Evol.* **53**, 99–112.
83. Castoe T.A., de Koning A.P.J., Kim H.-M., Gu W., Noonan B.P., Naylor G., Jiang Z.J., Parkinson C.L., Pollock D.D. 2009. Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 8986–8991.
84. Templeton A.R. 2009. Why does a method that fails continue to be used? The answer. *Evolution*. **63**, 807–812.
85. Templeton A.R. 2010. Coalescent-based, maximum likelihood inference in phylogeography. *Mol. Ecol.* **19**, 431–435.
86. Knowles L.L. 2008. Why does a method that fails continue to be used? *Evolution*. **62**, 2713–2717.
87. Beaumont M.A., Nielsen R., Robert C., et al. 2010. In defence of model-based inference in phylogeography. *Mol. Ecol.* **19**, 436–446.
88. Paulo O.S., Jordan W.C., Bruford M.W., Nichols R.A. 2002. Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of the Iberian lizard. *Mol. Ecol.* **11**, 809–819.
89. Morando M., Avila L.J., Sites J.W., jr. 2003. Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongates-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean-Patagonian South America. *Syst. Biol.* **52**, 159–185.
90. Gifford M.E., Larson A. 2008. *In situ* genetic difference in *Ameiva chrysolemus*: multilocus perspective. *Mol. Phyl. Evol.* **49**, 277–291.
91. O’Meara B.C. 2010. New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Syst. Biol.* **59**, 59–73.
92. Chapple D.G., Keogh J.S., Hutchinson M.N. 2004. Molecular phylogeography and systematics of the arid-zone members of the *Egernia whitii* (Lacertilia: Scincidae) species group. *Mol. Phyl. Evol.* **33**, 549–561.
93. Giribet G., DeSalle R., Wheeler W.C. 2002. “Pluralism” and the aims of phylogenetic research. In: *Molecular Systematics and Evolution*. Basel-Boston-Berlin: Birkhauser Verlag, P. 141.
94. Eckert A.J., Carstens B.C. 2008. Does gene flow destroy phylogenetic signal? The performance of three methods for estimating species phylogenies in the presence of gene flow. *Mol. Phyl. Evol.* **49**, 832–842.

95. Heled J., Drummond A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 570–580.
96. Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the Tree of Life. *Nature Rev. Genet.* **6**, 361–375.
97. Алифанов В.Р. 2007. Ящерицы в эпоху динозавров. *Природа*. **9**, 47–58.
98. Janes D. E., Organ C.L., Fujita M.K., Shedlock A.M., Edwards S.V. 2010. Genome evolution in Reptilia, the sister group of Mammals. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **11**, 239–264.
99. Hedges S.B., Vidal N. 2009. *Lizards, snakes, and amphisbaenians (Squamata)*. In: The Timetree of Life. Eds Hedges S.B. Kumar S. Oxford: Oxford University Press, pp. 383–389.
100. Sites J.W., Davis S.K., Guerra T., Iverson J.B., Snell H.L. 1996. Character congruence and phylogenetic signal in molecular and morphological data sets: a case study in the living iguanas (Squamata, Iguanidae). *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1087–1105.
101. Macey J.R., Larson A., Ananjeva N.B., Papenfuss T.J. 1997. Evolutionary shifts in the three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian. *J. Mol. Biol.* **44**, 660–674.
102. Fuller S., Baverstock P., King D. 1998. Biogeographic origins of goannas (Varanidae): a molecular perspective. *Mol. Phyl. Evol.* **9**, 294–307.
103. Harris D.J. 1999. Molecular systematics and evolution of lacertid lizards. *Nat. Croat.* **8**, 161–180.
104. Frost D.R., Rodrigues M.T., Grant T., Titus T.A. 2001. Phylogenetics of the lizards genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: Tropidurinae): direct optimization, descriptive efficiency, and sensitivity analysis of congruence between molecular data and morphology. *Mol. Phyl. Evol.* **21**, 352–371.
105. Bromham L., Woolfit M., Lee M.S.Y., Rambaut A. 2002. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. *Evolution*. **56**, 1921–1930.
106. Schulte J.A. II, Valladares J.P., Larson A. 2003. Phylogenetic relationships within Iguanidae inferred using molecular and morphological data and a phylogenetic taxonomy of iguanian lizards. *Herpetologica*. **56**, 399–319.
107. Whiting A.S., Bauer A.M., Sites J.W., jr. 2003. Phylogenetic relationships and limb loss in sub-Saharan African scincine lizards (Squamata: Scincidae). *Mol. Phyl. Evol.* **29**, 582–598.
108. Townsend T.M., Larson A., Louis E., Macey J.R. 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. *Syst. Biol.* **53**, 735–757.
109. Vidal N., Hedges S.B. 2009. The molecular evolution tree of lizards, snakes and amphisbaenians. *C. R. Biologies*. **332**, 129–139.
110. Carranza S., Arnold E.N. 2006. Systematics, biogeography, and evolution of *Hemidactylus* geckos (Reptilia: Gekkonidae) elucidated using mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **38**, 531–545.
111. Fry B.G., Vidal N., Norman J.A., Vonk F.J., Scheib H., Ramjan S.F.R., Kuruppu S., Fung K., Hedges S. B., Richardson M.K., Hodgson W.C., Ignjatovic V., Summerhayes R., Kochva E. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*. **439**, 584–588.
112. Arnold E.N., Arribas O., Carranza S. 2007. Systematics of the Palearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with description of eight new genera. *Zootaxa*. **1430**, 1–86.
113. Kumazawa Y. 2007. Mitochondrial genome from major lizard families suggest their phylogenetic relationships and ancient radiation. *Gene*. **388**, 19–26.
114. Carretero M.A. 2008. An integrated assessment of a group with complex systematics: Iberomaghrebian lizard genus *Podarcis* (Squamata: Lacertidae). *Integr. Zool.* **4**, 247–266.
115. Kaply P., Limberakis P., Poulakakis N., Mantziou G., Parmakelis A., Mylonas M. 2008. Molecular phylogeny of three *Mesalina* (Reptilia: Lacertidae) species (*M. gattulata*, *M. brevisrostris* and *M. bahaeldini*) from the North Africa and the Middle East: another case of paraphyly? *Mol. Phyl. Evol.* **49**, 102–110.
116. Conrad J.L. 2008. Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **310**, 1–182.
117. Keogh J.S. 1998. Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. *Biol. J. Linn. Soc.* **63**, 177–203.
118. Dong S., Kumazawa Y. 2005. Complete mitochondrial DNA sequences of six snakes: phylogenetic relationships and molecular evolution of genomic features. *J. Mol. Evol.* **61**, 12–22.
119. Lee M.S., Hugall A.F., Lawson R., Scanlon J.D. 2007. Phylogeny of snakes (Serpentes): combining morphological and molecular data in likelihood, Bayesian and parsimony analyses. *Syst. Biodivers.* **5**, 371–389.
120. Voris H.K., Karns D.R., Feldheim K.A., Kechavarti B., Rinehart M. 2008. Multiple paternity in the Oriental-Australian rear-ranged watersnake (Homalopsidae). *Herp. Cons. Biol.* **3**, 88–102.
121. Alfaro M.E., Karns D.R., Voris H.K., Brock C.D., Stuart B.L. 2008. Phylogeny, evolutionary history, and biogeography of Oriental-Australian rear-ranged water snakes (Colubroidea: Homalopsidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **46**, 576–593.
122. Rest J.S., Ast J.C., Austin C.C., Waddell P.J., Tibbetts E.A., Hay J.M., Mindell D.P. Molecular systematics of primary reptilian lineages and the tuatara mitochondrial genome. *Mol. Phyl. Evol.* **29**, 289–297.
123. Bryson R.W. Jr., Pastorini J., Burbrink F.T., Forstner M.R.J. 2007. A phylogeny of the *Lampropeltis mexicana* (Serpentes: Colubridae) based on mitochondrial DNA sequences suggests evidence for species-level polyphyly within *Lampropeltis*. *Mol. Phyl. Evol.* **43**, 674–684.
124. Cox S.C., Carranza S., Brown R.P. 2010. Divergence times and colonization of the Canary Islands by *Gallotia* lizards. *Mol. Phyl. Evol.* **56**, 747–757.
125. Guicking D., Lawson R., Joger U., Wink M. 2006. Evolution and phylogeny of the genus *Natrix* (Serpentes: Colubridae). *Biol. J. Linn. Soc.* **87**, 127–143.
126. Nardi F., Carapelli A., Fanciulli P.P., Dallai R., Frati F. 2001. The complete mitochondrial DNA sequence of the basal hexapod *Tetradontophora bielensis*: evi-

- dence for heteroplasmy and tRNA translocations. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1923–1304.
127. Lawson R., Slowinski J.B., Crother B.I., Burbink F.T. 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Mol. Phyl. Evol.* **37**, 581–601.
 128. Torres-Carvajal O., Schulte J.A. II, Cadle J.E. 2006. Phylogenetic relationships of South American lizards of the genus *Stenocercus* (Squamata: Iguania): a new approach using a general mixture model for gene sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* **39**, 171–185.
 129. Moritz C. 1994. Defining “evolutionary significant units” for cobservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 373–375.
 130. Honda M., Ota H., Sengoku S., Yong H.-S., Hikida T. 2002. Molecular evaluation of phylogenetic significances in the highly divergent karyotypes of the genus *Gonocephalus* (Reptilia: Agamidae) from tropical Asia. *Zool. Sci.* **19**, 129–133.
 131. Gillooly J.F., Allen A.P., West G.B., Brown J.H. 2005. The rate of DNA evolution: effects of body size and temperature on the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 140–145.
 132. Rand D.M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 125–131.
 133. Birky C.W., jr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 125–148.
 134. Nunn G.B., Stanley S.E. 1998. Body size effects and rates of Cytochrom *c* evolution in tube-nosed seabirds. *Mol. Biol. Evol.* **15**, 1360–1371.
 135. Soudheimer N., Glatz C.E., Tirone J.E., Deardorf M.A., Krieger A.M., Hakonarson H. 2011. Neutral mitochondrial heteroplasmy and the influence of aging. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1653–1659.
 136. Bromham L. 2002. Molecular clocks in reptiles: life history influences rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 302–309.
 137. Vitt L.J., Pianka E.R. 2004. *Historical patterns in lizard ecology: what teiids can tell us about lacertids*. In: The biology of lacertid lizards. Evolutionary and ecological perspectives. Eds Perrez-Melado V., Riera V., Perere A. Institut Menorqui d’Estudis. **V. 8**, pp. 139–157.
 138. Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95.
 139. Wallace D.C. 2010. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagenesis.* **51**, 440–450.
 140. Daniels S.R., Heideman N.J.L., Hendrics M.G.J., Mokone M.E., Crandall K.A. 2005. Unravelling evolutionary lineages in the limbless fossorial skinks genus *Acontias* (Sauria: Scincidae): are subspecies equivalent systematic units? *Mol. Phyl. Evol.* **34**, 645–654.
 141. Edwards D.L., Melvill J. 2011. Extensive phylogeographic and morphological diversity in *Diporiphora nobbi* (Agamidae) leads to a taxonomic review and a new species description. *J. Herpetol.* **45**, 530–546.
 142. Cinnery P.F., Dahl H.H.M. 2000. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* **16**, 500–505.
 143. Zhao X., Li N., Guo W., Hu X., Liu Z., Gong G., Wang A., Feng J., Wu C. 2004. Further evidence for paternal inheritance of mtDNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity.* **93**, 399–403.
 144. Schwartz M., Vissing J. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* **347**, 576–580.
 145. Kraysberg Y., Schwartz M., Brown T.A., Ebralidse K., Kunz W.S., Clayton D.A., Vissing J., Khrapko K. 2004. Recombination of human mitochondrial DNA. *Sci.* **304**, 981.
 146. Laloi D., Richard M., Lecomte J., Massot L., Clobert J. 2004. Multiple paternity in clutches of common lizard *Lacerta vivipara*: data from microsatellite markers. *Mol. Ecol.* **13**, 719–723.
 147. Grzybowski T., Malyarchuk B.A., Czarny J., Miscicka-Sliwka, Kotzbach R. 2003. High level of mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots: reanalysis and revision. *Electrophoresis.* **24**, 1159–1165.
 148. Wallis G.P. 1999. Do animal mitochondrial genomes recombine? *Trends Ecol. Evol.* **14**, 209–210.
 149. Gyllensten U.B., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature.* **352**, 255–257.
 150. Hagelberg E. 2003. Recombination or mutational rates heterogeneity? Implications for mitochondrial Eve. *Trends Genet.* **19**, 84–90.
 151. Podnar M., Meyer W., Tvrtkovic N. 2005. Biogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Mol. Ecol.* **14**, 575–588.
 152. Townsend T.M., Larson A., Louis E., Macey J.R. 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the Squamate. *Syst. Biol.* **53**, 735–757.
 153. Croucher P.J.P., Oxford G.S., Searle J.B. 2004. Mitochondrial differentiation, introgression and phylogeny of species in the *Teegenaria atrica* group (Araneae: Agelenidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **81**, 79–89.
 154. Densmore L.D., Wright J.W., Brown W.M. 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). *Genetics.* **110**, 689–707.
 155. Fonseca M.M., Brito J.C., Paulo O.S., Carretero M.A., Harris D.J. 2009. Systematic and phylogeographic assessment of the *Acanthodactylus erythrurus* group (Reptilia: Lacertidae) based on phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA. *Mol. Phyl. Evol.* **51**, 131–142.
 156. Jenuth J.P., Peterson A.C., Shoubridge E.A. 1997. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nature Genet.* **16**, 93–95.
 157. Ast J.C. 2001. Mitochondrial DNA evidence and evolution in Varanoidea (Squamata). *Cladistics.* **17**, 211–226.
 158. Petri B., von Haeseler A., Paabo S. 1996. Extreme sequence heteroplasmy in bat mitochondrial DNA. *Biol. Chem.* **377**, 661–667.
 159. Frey J.E., Frey B. 2004. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial Cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? *Hereditas.* **140**, 92–98.

160. Funk D.J., Omland K.E. 2003. Species-level paraphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **34**, 397–423.
161. Reiner J.E., Kishare R.B., Levin B.C., Albanetti T., Boire N., Knipe A., Helmersson K., Deckman K.H. 2010. Detection of heteroplasmic mitochondrial DNA in single mitochondria. *PLoS One*, **5**, e14359.
162. Nachman M.W., Brown W.M., Stoneking M., Aquadro C.F. 1996. Nonneutral mitochondrial DNA variation in humans and chimpanzees. *Genetics*, **142**, 953–963.
163. Jackman T.R., Irschnic D.J., de Quairroz K., Losos J.B., Larson A. 2002. Molecular phylogenetic perspective on evolution of lizards of the *Anolis grahami* series. *J. Exp. Zool. (Mol. Biol. Dev. Evol.)*, **294B**, 1–16.
164. Thorpe R.S., Leadbeater D.L., Pook C.E. 2005. Molecular clock and geological dates: Cytochrome *b* of *Anolis extremus* substantially contradicts dating of Barnados emergence. *Mol. Ecol.* **14**, 2087–2096.
165. Pereira S.L., Baker A.J. 2006. A multigenomic timescale for birds defects variable phylogenetic rates of molecular evolution and refute the standart molecular clock. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 1731–1740.
166. Smith S.A., Sadler R.A., Bauer A.M., Austin C.C., Jackman T. 2007. Molecular phylogeny of the scincid lizards of New Caledonia and adjacent areas: evidence for a single origin of the endemic skinks of Tasmania. *Mol. Phyl. Evol.* **43**, 1151–1166.
167. Weinreich D.M., Rand D.M. 2000. Contrasting patterns of nonneutral evolution in proteins encoded in nuclear and mitochondrial genomes. *Genetics*, **156**, 385–399.
168. Bazin E., Glemin S., Galtier N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Sci.* **312**, 570–572.
169. Hudson R.R., Torelli M. 2003. Stochasticity overrules the “three-times rule”: genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution*, **57**, 182–190.
170. Irwin D.M., Kocher T.D., Wilson A.C. 1991. Evolution of the Cytochrome *b* gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128–144.
171. Lopez P., Casane D., Philippe H. 2002. Heterotachy, an important process of protein evolution. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1–7.
172. Jiang Z.J., Castoe T.A., Austin C.C., Burbrink F.T., Heron M.D., McGuire J.A., Parkinson C.L., Pollock D.D. 2007. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicated control region. *BMC Evol Biol.* **7**, 123–137.
173. Kumazawa Y. 2004. Mitochondrial DNA sequences of five squamates: phylogenetic affiliation of snakes. *DNA Res.* **11**, 137–144.
174. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond.* **270**, 313–321.
175. Norman J.E., Gray M.W. 2001. A complex organization of the gene encoding Cytochrome oxidase subunit 1 in the mitochondrial genome of the dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*: homologous recombination generates two different *cox1* open reading frames. *J. Mol. Evol.* **53**, 351–363.
176. Rubinoff D., Cameron S., Will K. 2006. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *J. Heredity*, **97**, 581–594.
177. Harris D.J., Sa-Sousa P. 2001. Species distinction and relationships of the western Iberian *Podarcis* lizards (Reptilian, Lacertidae) based on morphology and mitochondrial DNA sequences. *Herpetol. J.* **11**, 129–136.
178. Meyer A. 1994. Shortcomings of the Cytochrome *b* gene as molecular marker. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 278–280.
179. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S., Villablanca F.X., Wilson A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6196–6200.
180. Castoe T., de Koning A.P., Kim H.-M., Gu W., Noonan B.P., Naylor G., Jiang Z.J., Parkinson C.L., Pollock D.D. 2009. Evidence for an ancient adaptive episode of convergent molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8986–8991.
181. Albert E.M., San Mauro D., Garcia-Paris M., Ruber L., Zardoya R. 2009. Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene*, **441**, 12–21.
182. Baker R.J., Bradly R.D. 2006. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J. Mammol.* **87**, 643–662.
183. Chen Q.-L., Tang X.-S., Yao W.-J., Lu S.-Q. 2009. Bioinformatics analysis the complete sequences of cytochrome *b* of *Takydromus sylvaticus* and modeling the tertiary structure of encoded protein. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 596–602.
184. Rokas A., Ladoukakis E., Zouros E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends Ecol. Evol.* **18**, 411–417.
185. Shierup M.H., Hein J. 2000. Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics*, **156**, 879–891.
186. Posada D., Crandal K.A. 2002. The effect of recombination on the accuracy of phylogenetic estimation. *J. Mol. Evol.* **54**, 396–402.
187. Piganeau G., Gardner M., Eyre-Walker A. 2004. A broad survey of recombination in animal mitochondria. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 2319–2325.
188. Macey J.R., Schulte J.A., Ananjeva N.B., Larson A., Rastegar-Pouyani N., Shammakov S.M., Pappenfus T.J. 1998. Phylogenetic relationships among agamid lizards of *Laudakia caucasica* species group: testing hypothesis of biogeographical fragmentation and an area cladogram for the Iranian plateau. *Mol. Phyl. Evol.* **10**, 118–131.
189. Hoarau G., Holla S., Lescasse R., Stam W.T., Olsen J.L. 2002. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Plathichthys flesus*. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 2261–2264.
190. Shao R., Mitani H., Barker S.C., Takahasi M., Fukunaga M. 2005. Novel mt gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recom-

- bination in the chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *J. Mol. Evol.* **60**, 764–773.
191. Okajima Y., Kumazawa Y. 2010. Mitochondrial genomes of acrodont lizards: timing of gene rearrangements and phylogenetic and biogeographic implications. *BMC Evol. Biol.* **10**, 141–156.
192. Amer S.A.M., Kumazawa Y. 2005. Mitochondrial genome of *Pogona vitticeps* (Reptilia: Agamidae): control region duplication and the origin of Australian agamids. *Gene*. **346**, 249–256.
193. Amer S.A.M., Kumazawa Y. 2008. Timing of a mtDNA gene rearrangement and intercontinental dispersal of varanid lizards. *Gene Genet. Syst.* **83**, 275–280.
194. Sammler S., Bleidorn C., Tiedemann R. 2011. Full mitochondrial genome sequences of two endemic Philippine hornbill species (Aves: Bucerotidae) provide evidence for pervasive mtDNA recombination. *BMC Genomics*. **12**, 35.
195. Chan K.M.A., Levin S.A. 2005. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution*. **59**, 720–729.
196. Bensasson D., Zhang D.-X., Hartl D.L., Hewitt G.M. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 314–322.
197. Hazkani-Covo E., Zeller R.M., Martin W. 2010. Molecular poltergeites: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genome. *PLOS Genet.* **6**, e10000834.
198. Газиев А.И., Шайкаев Г.О. 2010. Ядерные митохондриальные псевдогены. *Молекуляр. биология*. **44**, 405–417.
199. Sunnick P., Hales D.F. 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I–II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphyidae). *Mol. Biol. Evol.* **13**, 510–524.
200. Woischnic M., Moraes C.T. 2002. Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome. *Genome Res.* **12**, 885–893.
201. Lopez P., Yuhki N., Masuda R., Modi W., O'Brien S.J. 1994. *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.* **39**, 174–190.
202. Zhang D.-X., Hewitt G.M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 247–251.
203. Greenwood A., Paabo S. 1999. Nuclear insertion sequences of mtDNA predominant in hair but not in blood of elephants. *Mol. Ecol.* **8**, 133–137.
204. Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Brandon M., Wallace D.C. 2004. Mitochondrial DNA-like sequences in the nucleus (Numt): insights into our African origins and the mechanism of foreign DNA integration. *Hum. Mutat.* **23**, 125–133.
205. Triant D.A., DeWoody J.A. 2007. The occurrence, detection, and avoidance of mitochondrial DNA translocations in mammalian systematics and phylogeography. *J. Mammol.* **88**, 908–920.
206. Dorner M., Altmann M., Paabo S., Morl M. 2001. Evidence for import of lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2688–2698.
207. Funes S., Davidson E., Claros M.G., van List R., Perez-Martinez X., Varquez-Acevedo M., King M.P., Gonzalez-Halphen D. 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamidomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **277**, 6051–6058.
208. Miraldo A., Hewitt G.M., Dear P.H., Paulo D.S., Emerson B.C. 2012. Numts help us to reconstruct the demographic history of the ocellated lizard (*Lacerta lepida*) in a secondary contact zone. *Mol. Ecol.* **21**, 1005–1018.
209. Podnar M., Haring E., Pinsker W., Mayer W. 2007. Unusual origin of a nuclear pseudogene in the Iberian wall lizard: intergenomic and interspecific transfer of a large section of the mitochondrial genome in the genus *Podarcis* (Lacertidae). *J. Mol. Evol.* **64**, 308–320.
210. Kizirian D., Trager A., Donnelly M.A., Wright J.W. 2004. Evolution of Galapagos Island lava lizards (Iguania: Tropiduridae: *Microlophus*). *Mol. Phyl. Evol.* **32**, 761–769.
211. Jesus J., Harris D.J., Brehm A. 2005. Phylogeography of *Mabuya maculilabris* (Reptilia) from Sao Tome Island (Gulf of Guinea) inferred from mtDNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **37**, 503–510.
212. Steinfartz S., Glaberman S., Lanterbecq D., Russello M.A., Rosa S., Hanley T.C., Marquez C., Snell H.L., Snell H.M., Gentile G., Dell'Olmo G., Powell A.M., Caccone A. 2009. Progressive colonization and restricted gene flow shape island-dependent population structure in Galapagos marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *BMC Evol. Biol.* **9**, 297–315.
213. Poulakakis N., Lymberakis P., Valakos E., Zouros E., Mylonas M. 2005. Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula, by Bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **37**, 845–857.