

УДК 597.851 (470.67)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗЕРНЫХ ЛЯГУШЕК
PELOPHYLAX RIDIBUNDUS РЕСПУБЛИКИ ДАГЕСТАН
(ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК)**

© 2016 О.А. Ермаков¹, А.И. Файзулин², А.Д. Аскендеров^{3,4}, А.Ю. Иванов¹

¹ Пензенский государственный университет, г. Пенза

² Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

³ Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

⁴ Дагестанский государственный университет, г. Махачкала

Статья поступила в редакцию 14.05.2016

Проведен молекулярно-генетический анализ 20 особей *Pelophylax ridibundus* complex из 4 пунктов, расположенных на территории Республики Дагестан по двум молекулярным маркерам – первой субъединице гена цитохром оксидазы (COI) мтДНК и первому интрону гена сывороточного альбумина (SAI-1) яДНК. Установлено, что у обитающих в Республике Дагестан озерных лягушек преобладает тип мтДНК специфичный для «восточной» формы (=анатолийская *P. cf. bedriagae*), и полностью отсутствует тип мтДНК характерный для «западной» (=центрально-европейская *P. ridibundus*). В тоже время анализ ядерного маркера показал присутствие в изученном регионе аллелей «западной» формы озерной лягушки, которые встречаются здесь значительно реже, чем «восточной», в соотношении частот равном 1:9
Ключевые слова: озерная лягушка, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, цитохром оксидаза, сывороточный альбумин, Республика Дагестан.

В настоящее время на основе молекулярно-генетических данных озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) рассматривается как комплекс видов [1, 9-11]. На территории Большого Кавказа и сопредельных регионах, по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК (далее мт- и яДНК), отмечено обитание двух генетически дифференцированных форм озерной лягушки – «западной» (=центрально-европейская *P. ridibundus*) и «восточной» (=анатолийская *P. cf. bedriagae*), а также а также сестринской последней – «евфратской» формы («Euphrates») [6, 12, 3]. В Дагестане озерная лягушка распространена практически повсеместно, в водоемах водоемы низменной, предгорной и местами горной зоны в диапазоне высот от – 6 до 1800 м над у.м. [8]. По результатам анализа мтДНК в двух локалитетах на территории республики отмечена «восточная» форма – *P. cf. bedriagae* [6].

В задачи настоящего исследования входило изучение распределения маркеров как мт-, так и яДНК «восточной» и «западной» форм в популяциях озерных лягушек, обитающих на территории Республики Дагестан.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала проведен в 2016 году. Всего молекулярно-генетическим методом исследо-

вано 20 особей из 4 пунктов, расположенных на территории Республики Дагестан (табл. 1).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК методом высаливания [7] брали первые фаланги пальцев задних конечностей или мазок эпителия ротовой полости, фиксированные в 96% этаноле. Использовались 2 молекулярно-генетических маркера: для мтДНК – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы (COI), для яДНК – интрон 1 гена сывороточного альбумина (SAI-1). Принадлежность гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК к «западной» или «восточной» формам устанавливалась по методике, опубликованной нами ранее [2, 3, 5].

При расчете частот встречаемости гаплотипов учитывалось, что мтДНК является гаплоидной и формально может рассматриваться как один аллель, поэтому количество аллелей и экземпляров равно. Ядерная ДНК диплоидна, содержит два аллеля одного гена, соответственно доли аллелей и экземпляров той или иной формы различны в зависимости от соотношения гомо- и гетерозиготных особей. Различия частот аллелей оценивались с помощью двустороннего критерия Фишера (F, two-tailed) в программе STATISTICA v.10 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа маркера митохондриальной ДНК показали наличие у всех исследованных экземпляров озерных лягушек Дагестана митотипов, специфичных только для «восточной» формы (табл. 2; рис.), что подтверждает широкое распространение аллелей *P. cf. bedriagae* на Кавказе.

Ермаков Олег Александрович, кандидат биологических наук, доцент. E-mail: enf@pnzgu.ru

Файзулин Александр Ильдусович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.

Аскендеров Азим Даниялович, младший научный сотрудник. E-mail: pibrdnrcan@mail.ru

Иванов Алексей Юрьевич, аспирант.

Таблица 1. Объем и места сбора исследованного материала в Республике Дагестан

№	Локалитет	n	Координаты		Высота н.у.м., м	Биотоп
			с.ш., °	в.д., °		
1	Кизилюртовский р-н, 1,5 км Ю-В с. Мацеевка	5	43°15'	46°59'	-6	оросительная канава
2	Кизилюртовский р-н, 0,5 км Ю с. Кульзеб	5	43°09'	47°00'	56	пруд
3	Сергокалинский р-н, 3 км Ю-З с. Сергокала	5	42°25'	47°38'	620	берег р. Какаозень
4	Табасаранский р-н, 3,4 км Ю-В с. Гелинботан	5	41°55'	48°12'	136	берег р. Камышчай

Примечание: Номера, указанные перед адресом, соответствуют таковым на рисунке и в табл. 2

Особи с мтДНК «западной» формы на территории Дагестана нами не обнаружены. Ближайшие места находок лягушек с мтДНК *P. ridibundus* s. s. отмечены севернее – на территории Ставропольского края, Калмыкии и Астраханской области выше 44° с.ш. [6; наши неопубликованные данные]. Отметим, что экземпляров несущих митотип сестринской *P. cf. bedriagae* «евфратской» формы, встречающейся на территории от Персидского залива, до восточной Турции, западного Ирана [6] и юга Армении [3], среди озёрных лягушек Дагестана не обнаружено, что позволяет ограничить ареал формы “Euphrates” южным склоном Большого Кавказа.

Результаты анализа маркера ядерной ДНК показали, что кроме аллелей гена SAI, характерного для «восточной» формы, у озерных лягушек Дагестана встречаются аллели, специфичные для «западной» формы, при соотношении частот аллелей равным 9:1. 80% особей диагностировались как гомозиготы «восточной» формы (ВВ) и 20% являлись гетерозиготами (ВR), гомозигот «западной» формы (RR) не обнаружено (табл. 2; рис.).

Полученные результаты выявили некоторое несоответствие частот распределения маркеров мт- и яДНК у озерных лягушек из Республики Дагестан, а именно отсутствие «западных» гаплотипов мтДНК при наличии «западных» аллелей в ядерном геноме. Если результаты анализа маркера мтДНК показали наличие в общей выборке только гаплотипов *P. cf. bedriagae*, то ис-

следования маркера яДНК выявили присутствие в выборке аллелей *P. ridibundus* на уровне 10%. Различия частот распределения маркеров статистически достоверны ($\chi^2=4,62, p=0,0431$). Частота аллелей яДНК «восточной» формы возрастает в направлении с севера на юг – от Терско-Сулакской низменности (точки 1 и 2) до Предгорного Дагестана (точки 3 и 4) (таб. 1, 2; рис.).

На территории Нижнего Поволжья – Волгоградской и Астраханской областях, в отличие от Дагестана, у озерных лягушек преобладают аллели яДНК характерные для «западной» формы [4; наши неопубликованные данные]. Это позволяет предполагать, что зона перехода от доминирования в популяциях лягушек аллелей «восточной» формы к преобладанию аллелей «западной» формы расположена в юго-западной части Прикаспийской низменности между 43° и 46° с.ш.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование проведено при частичной поддержке гранта РФФИ (№ 14-04-97031 р_поволжье_a).

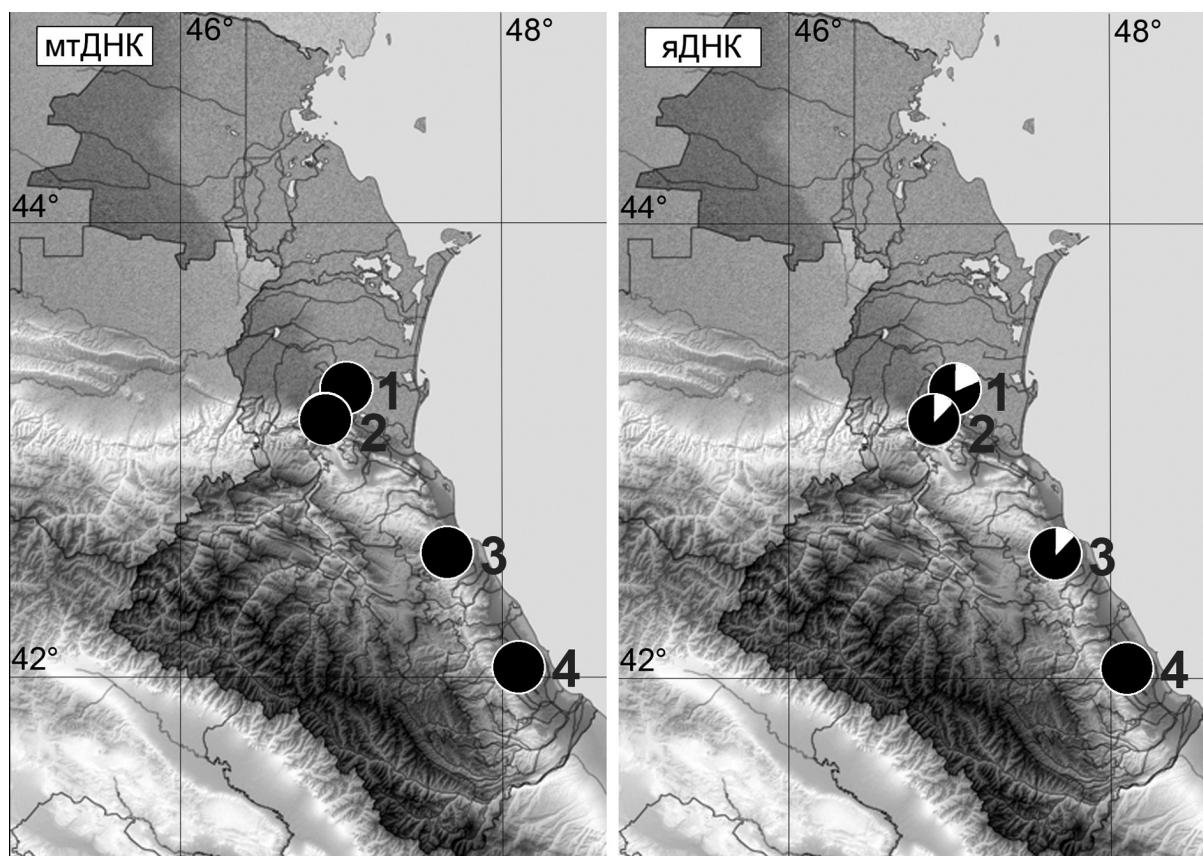
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринков Д.В. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. Вып. 8. С. 936-960.

Таблица 2. Соотношение типов мт- и яДНК в выборках озерных лягушек (n = 20) Республики Дагестан

№	Локалитет	n	COI мтДНК		SAI-1 яДНК	
			В	ВВ	ВВ	ВВ
1	Мацеевка	5	5	3	2	
2	Кульзеб	5	5	4	1	
3	Сергокала	5	5	4	1	
4	Гелинботан	5	5	5	–	
	ИТОГО	20 (100%)	20 (100%)	16 (80%)	4 (20%)	

Примечание: В – гаплотипы мтДНК и аллели яДНК «восточной» формы, R – аллели яДНК «западной» формы



● *cf. bedriagae* ○ *ridibundus*

Рис. Распределение гаплотипов митохондриальной и аллелей ядерной ДНК у озерных лягушек в Республике Дагестан. Номера точек соответствуют табл. 1 и 2

2. Ермаков О.А., Закс М.М., Тимов С.В. Диагностика и распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК) Вестник ТГУ. 2013. Т.18, вып.6. С. 2999-3002.
3. Ермаков О.А., Симонов Е.П., Иванов А.Ю., Замалетдинов Р.И., Файзулин А.И. Генетические формы озёрной лягушки (*Pelophylax ridibundus* complex) Западного Кавказа по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК // Труды ИБВВ РАН. Вып. 73 (76) (в печати).
4. Ермаков О.А., Файзулин А.И., Закс М.М., Кайбелева Э.И., Зарипова Ф.Ф. Распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. на территории Самарской и Саратовской областей (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. Т. 16, № 5(1). С. 409-412.
5. Закс М.М., Быстракова Н.В., Ермаков О.А., Тимов С.В. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой международной молодежной конференции герпетологов России и сопредельных стран. СПб., 2013. С. 86-89.
6. Akin C., Bilgin C.C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S.N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., et al. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic // J Biogeogr. 2010. V. 37. P. 2111-2124.
7. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25. P. 4692-4693.
8. Mazanaeva L.F. The distribution of Amphibians in Dagestan // Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union. Vol. 5. Sophia, 2000. P. 141-156.
9. Plötner J. 2005. Die westpaläarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld. 160 s.
10. Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaeartic water frogs // J. Evol. Biol. 2008. Vol. 21. P. 668-681.
11. Plötner J., Baier F., Akin C., Mazepa G., Schreiber R., Beerli P., Litvinchuk S.N., Bilgin C.C., Borkin L., Uzzell T. Genetic data reveal that water frogs of Cyprus (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin // Zoosyst. Evol. 2012. Vol. 88 (2). P. 261-283.
12. Stepanyan I., Schreiber R., Plötner J. On the systematic status of water frogs in Armenia and southern part of

Nagorno Karabakh republic // Материалы международной научной конференции «Биологическое

разнообразие и проблемы охраны фауны Кавказа». Ереван, 2011. С. 291-292.

**MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS
OF MARSH FROG FROM THE REPUBLIC OF DAGESTAN
(BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA DATA)**

© 2016 O.A. Ermakov¹, A.I. Fayzulin², A.D. Askenderov^{3,4}, A. Ju. Ivanov¹

¹ Penza State University, Penza

² Institute of Ecology of Volga Basin RAS, Togliatti

³ Pricaspiyskiy Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

⁴ Dagestan State University, Makhachkala

Molecular genetic analysis of 20 specimen of *Pelophylax ridibundus* complex from 4 locations in Republic of Dagestan (Russia) were conducted using COI and SAI-1 DNA markers. The mtDNA haplotype typical for “east-ern” form of marsh frog (=Anatolian *P. cf. bedriagae*) is prevalent in Republic of Dagestan, while haplotype pe-culiar to the “western” form (=Central European *P. ridibundus*) is fully absent. Analysis of nuDNA nevertheless revealed remarkable presence of alleles belonging to the “western” form of marsh frog in the studied area. The mean ratio of “western” and “eastern” allele frequencies is close to 1:9.

Keywords: marsh frog, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, cytochrome oxidase, serum albumin, Republic of Dagestan.

Oleg Ermakov, Candidate of Biology, Associate Professor.

E-mail: enf@pnzgu.ru

Alexander Fayzulin, Candidate of Biology, Senior Research Fellow.

Azim Askenderov, Associate Research Fellow.

Alexey Ivanov, Graduate Student.