

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ДВУХ ФОРМ ОБЫКНОВЕННОЙ ЧЕСНОЧНИЦЫ *PELOBATES FUSCUS* (*PELOBATIDAE*, *ANURA*, *AMPHIBIA*), РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО РАЗМЕРУ ГЕНОМА

© М. Д. Халтурин,<sup>1,\*</sup> С. Н. Литвинчук,<sup>1</sup> Л. Я. Боркин,<sup>2,3</sup> Ю. М. Розанов,<sup>1</sup> К. Д. Мильто<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, <sup>2</sup> Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, и <sup>3</sup> С.-Петербургский союз ученых;

\* электронный адрес: [mkh@medport.ru](mailto:mkh@medport.ru)

У двух географических криптических форм *Pelobates fuscus*, различающихся по количеству ядерной ДНК, методом электрофореза в полиакриламидном геле изучена изменчивость 14 белков, кодируемых предположительно 23 локусами. Обнаружены значительные различия между выборками по изоферментным спектрам. Генетические дистанции (Nei, 1972) между ними составили в среднем 0.311 (0.055—0.563), в то время как внутри каждой из этих форм они были, как правило, меньше и составляли в среднем 0.202 (0.023—0.388) у «западной» формы и 0.119 (0.021—0.317) у «восточной». Эти данные демонстрируют заметную генетическую дифференциацию между обеими формами. Генетические различия между обеими формами *P. fuscus* и сирийской чесночницей *P. syriacus* составляют в среднем 0.943.

Ключевые слова: криптическое видообразование, размер генома, электрофорез белков, *Pelobates fuscus*, *P. syriacus*.

В последнее время помимо обычных для эволюционно-таксономических исследований методов секвенирования, электрофореза белков, кариологических и др. все чаще стали использовать проточную ДНК-цитометрию. Этот метод позволяет точно и быстро измерять размер генома — базовую характеристику, отражающую изменения, происходящие в ядерном геноме в целом. До недавнего времени было общепринято, что размер генома — это стабильный признак, и поэтому все особи и популяции одного вида в норме должны были бы иметь одинаковые или весьма близкие его значения (Cavalier-Smith, 1985). Это обстоятельство привлекло к этому признаку большое внимание со стороны систематиков и эволюционистов. Однако признание неизменной стабильности размера генома у вида на практике привело к тому, что авторы делали свои выводы на основе измерения единичных экземпляров, без указания места их сбора. Возникавшие время от времени несоответствия в значениях размера генома для одного и того же вида объясняли техническими погрешностями (различиями в методических деталях), которые действительно в ряде случаев могут иметь место.

Однако исследования в пределах одной и той же лаборатории с использованием одинаковых красителей и оборудования позволили обнаружить, что не только виды, но и некоторые популяции в рамках одного и того же вида могут достоверно различаться по количеству ядерной ДНК (Mazin, Borokin, 1979; Sherwood, Patton, 1982; Borokin et al., 1986; Licht, Lovvcock, 1991; Lockwood, Bickham, 1992). Как оценивать такие различия? Одно из решений исходит из упомянутого выше посту-

лата о стабильности размера генома. Тогда различающиеся по количеству ядерной ДНК популяции должны рассматриваться как самостоятельные виды. Однако нельзя исключать и того, что возможны и собственно внутривидовые изменения размера генома. В этом случае выборки с различными геномами не обязательно являются различными видами. Ответ на этот вопрос могут дать исследования с использованием различных, не связанных друг с другом молекулярно-биохимических методов.

В ходе недавних исследований по изучению изменчивости размера генома у обыкновенной чесночницы *Pelobates fuscus* с помощью проточной ДНК-цитометрии нами было обнаружено, что на территории Восточной Европы этот вид имеет две географически обособленные и хорошо различающиеся по размеру генома группировки — «западную» и «восточную» формы (Barabanov et al., 1998; Боркин, 1999; Боркин и др., 2001; Borokin et al., 2001).

Западная форма была выявлена нами в Латвии, на северо-западе и в центре европейской части России (Ленинградская, Псковская, Ярославская и Тульская области), в Белоруссии (Брестская и Гомельская области), на Украине (Сумская, Киевская, Черниговская и Одесская области) и в Молдавии. Таким образом, она распространена к западу от линии, проходящей по Ярославской, Тульской, Черниговской и Одесской областям. Восточная форма, по нашим цитометрическим данным, найдена в центре европейской части России (Белгородская, Липецкая, Тамбовская, Воронежская, Рязанская и Пензенская области), в Поволжье (Нижегородская, Самар-

ская, Ульяновская и Астраханская области, Удмуртия, Башкортостан и Мордовия), в Предкавказье (Ставропольский край), а также на северо-востоке Украины (Харьковская обл.).

Согласно последним, наиболее полным данным, основанным на изучении количества ядерной ДНК у 260 особей из 46 популяций (Borkin et al., 2001), размер генома у западной формы равен 8.70—9.01 пг (в среднем 8.80 пг), а у восточной формы 9.16—9.50 пг (в среднем 9.33 пг). Различия между средними составляют примерно 5.8 %, причем размах изменчивости обеих форм не перекрывается.

С таксономической точки зрения все изученные нами восточноевропейские популяции чесночниц относятся не только к одному виду, но даже к одному и тому же подвиду (*P. fuscus fuscus*). Кроме того, по внешним морфологическим признакам, традиционно используемым в систематике, обе геномные формы чесночниц оказались весьма сходными. Однако географически закономерное распределение двух форм *P. fuscus*, различия между которыми имеют устойчивый характер и были воспроизводимы при анализе выборок в разные годы, с очевидностью указывает на то, что обнаруженное нами явление не случайно.

Поэтому нами выдвинуто предположение о том, что в случае с *P. fuscus* мы имеем дело с так называемым криптическим видообразованием, приводящим к образованию внешне практически неразличимых, но генетически различных видов (Майр, 1968, 1974; Воронцов, 1999). Однако оценка уровня дивергенции между западной и восточной формами *P. fuscus* и их таксономического статуса только на основании размера генома затруднена из-за недостаточной изученности свойств этого параметра в целом.

Целью настоящей работы были изучение аллозимной изменчивости у *P. fuscus*, а также оценка уровня генетической дивергенции между двумя географическими криптическими формами, различающимися по размеру генома.

## Материал и методика

С помощью электрофореза белков исследованы 149 особей *Pelobates fuscus* (20 выборок) и 4 особи *Pelobates syriacus* (1 выборка), собранных на территории России, Украины и Азербайджана (табл. 1; рис. 1). Пробы тканей мышц и печени брали в лаборатории и до проведения электрофореза сохраняли при температуре -70 °С. Изменчивость 14 ферментов (табл. 2) определяли методом электрофореза в 6—8 %-ном полиакриламидном геле в различных буферных системах (Серов и др., 1977). При этом использовали стандартные методики гистохимического выявления активности белков (Shaw, Prasad, 1970). Обозначения и номера ферментов приводятся согласно принятой номенклатуре (IUBNC, 1984).

Среднюю ожидаемую гетерозиготность и генетические дистанции ( $D_N$ ) по Нею (Nei, 1972) рассчитывали с использованием компьютерной программы BIOSYS-1. На основании показателя генетического сходства популяций построена дендрограмма по методу UPGMA или невзвешенного парно-группового кластерного анализа (Sneath, Sokal, 1973). Такой подход считается наиболее адекватным по сравнению с другими (Guiller et al., 1998; Wiens, Servedio, 1998; Wiens, 2000).

## Результаты

В результате электрофоретического анализа ферментов было идентифицировано 23 локуса. 4 аллеля были выявлены только в локусах LDH-1 и PGDH-1, 3 — в GPDH-2, G6PD-1, G6PD-2, sMDH-2 и SOD-1 (табл.3). Изменчивыми хотя бы в одной из выборок были sAAT-1, sAAT-2, AAT-L, CK, EST-1, GLUD-1, GLUD-2, GLUD-3, GPDH-1, IDDH-1, IDDH-2, IDH-1 и LDH-2. Остальные 3 локуса (sMDH-1, PGDH-2 и PGM) оказались инвариантными.

Смена преобладающих типов аллельных вариантов для двух криптических форм *P. fuscus* отмечена для блоксов -- AAT-L, sAAT-1, CK, EST-1, GLUD-1 и G6PD-1. Обращают на себя внимание устойчивые различия между обеими формами чесночниц по экспрессии изозимов локуса LDH-1 в печени (рис.2). *Pelobates syriacus* отличается от западной формы *P. fuscus* по 8 диагностическим локусам (sAAT-2, GPDH-2, G6PD-2, IDDH-2, LDH-1, LDH-2, SOD-1 и PGDH-1), а от восточной формы — по 7 диагностическим локусам (sAAT-2, GPDH-2, G6PD-2, IDDH-2, LDH-1, LDH-2 и PGDH-1). По 2 локусам (GLUD-1 и PGM) аллельные варианты у *P. syriacus* нам не удалось идентифицировать.

У обеих форм *P. fuscus* гетерозиготы по альтернативным аллельным вариантам 6 полудиagnostических локусов (sAAT-1, AAT-L, CK, EST-1, GLUD-1 и G6PD-1) отмечены во всех выборках, за исключением Ленинградской и Липецкой областей. В большинстве выборок встречаемость «чужих» аллелей не превышала 25 % (табл.3; рис. 1). У восточной формы *P. fuscus* лишь в одной выборке (Воронежская обл.) было обнаружено более высокое количество чужих аллелей (43 %). У западной формы сразу в 4 выборках количество аллелей, характерных для восточной формы, было очень высоким. Так, в выборке из Черниговской обл. доля чужих аллелей составляла 31%, а из Брестской — 33%. В выборках из Сумской и Гомельской областей вообще преобладали чужие аллели (63 и 64% соответственно).

Значения средней гетерозиготности у *P. fuscus* в различных выборках оказались достаточно близкими и колебались в пределах от 0.074 до 0.259 (табл. 3; учтены только выборки с числом особей не менее 9). Размах изменчивости этого параметра у обеих форм был почти одинаковым. У западной формы наименьшая гетерозиготность была отмечена у чесночниц из Псковской обл. (0.074), наибольшая — из Черниговской обл. (0.259). У восточной формы минимальные значения средней гетерозиготности были зафиксированы в Воронежской обл. (0.101), наибольшие — в Ульяновской обл. (0.172). Средняя ожидаемая гетерозиготность в выборках обеих форм *P. fuscus* оказалась сходной, составив 0.141 (у западной формы) и 0.136 (у восточной). У *P. syriacus* уровень гетерозиготности оказался сравнительно низким (0.083).

Значения  $D_N$  между всеми изученными популяциями *P. fuscus* находились в интервале от 0.021 до 0.563 (табл. 4). Наименьшая дистанция была отмечена между выборками из Ульяновской и Самарской областей (обе относятся к восточной форме), а наибольшая — между выборками из Псковской (западная форма) и Липецкой (восточная форма) областей. Дистанция между выборками в пределах *P. fuscus* западного типа в среднем составила 0.202 (0.023—0.388), а внутри восточного — 0.119 (0.021—0.317). Различия между выборками, относящи-

Таблица 1

Места сбора, изменчивость размера генома и количество особей у *Pelobates fuscus* и *P. syriacus*, исследованных методом проточной ДНК-цитометрии (ЦМ) и электрофореза белков (ЭФ)

Но- мер	Район сбора	Выборка	Размер генома, пг	Число особей	
				ЦМ	ЭФ
<i>Pelobates fuscus</i> , западная форма					
1	Латвия	Рига	8.74	1	—
2	Псковская обл.	Осыно	8.70—8.82	12	4
		Идрица	8.74—8.86	7	6
		Песчанка	8.75—8.83	8	5
		Рыболовка	8.78—8.84	3	3
3	Ленинградская обл.	Луга	8.81	1	1
4	Ярославская обл.	Борок	8.82	1	1
5	Тульская обл.	Тула	8.85—9.01	4	4
6	Брестская обл.	Медно	8.70—8.74	3	3
7	Гомельская обл.	Боровая	8.83—8.93	10	10
8	Сумская обл.	Антоновка	8.88—8.95	6	6
		Старая Гута	8.87	1	1
9	Киевская обл.	Киев (Черторый)	8.85	1	1
		Киев (Конча Заспа)	8.78—8.85	5	—
10	Черниговская обл.	Нежин	8.84—8.96	7	7
		Фаевка	8.76	1	1
		Наумовка	8.80—8.84	2	1
11	Одесская обл.	Вилково	8.76—8.80	3	—
12	Молдавия	Кантемир	8.90	1	—
		Унгены	8.94	1	—
<i>Pelobates fuscus</i> , восточная форма					
13	Харьковская обл.	Харьков	9.42	1	—
14	Белгородская обл.	Борисовка	9.16—9.29	5	—
15	Липецкая обл.	Буховое	9.34—9.44	3	3
16	Тамбовская обл.	Чистые Пруды	9.38—9.44	2	—
		Заречье	9.30—9.48	13	13
		Оржевка	9.39	1	1
		Большая Липовица	9.37—9.50	10	—
		Рязань	9.16—9.19	2	2
17	Рязанская обл.	Гусь-Железный	9.26—9.39	3	—
		Ичалки	9.23—9.32	5	5
18	Нижегородская обл.	Решетиха	9.24—9.32	4	4
		Кильмезь	9.23—9.36	15	7
19	Удмуртия	Боярка	9.31—9.43	13	7
		Крымская Слудка	9.30	1	1
		Ижевск	9.38	1	—
20	Башкортостан	Амзя	9.36—9.48	5	5
21	Мордовия	Яма	9.39—9.41	2	—
22	Пензенская обл.	Верховья р. Хопер	9.41	1	—
23	Самарская обл.	Шелехметь	9.31—9.40	4	4
		Нижнее Сенгелеево	9.36—9.50	37	—
		Тимашево	9.38—9.45	7	—
24	Воронежская обл.	Росошь	9.24—9.34	35	32
25	Ульяновская обл.	Ульяновск	9.38—9.49	10	9
26	Астраханская обл.	Астрахань	9.29	1	1
		Джелга	9.17—9.39	10	—
27	Ставропольский край	Ставрополь	9.49	1	1
<i>Pelobates syriacus</i>					
28	Азербайджан	Мошхан	8.02—8.39	4	4

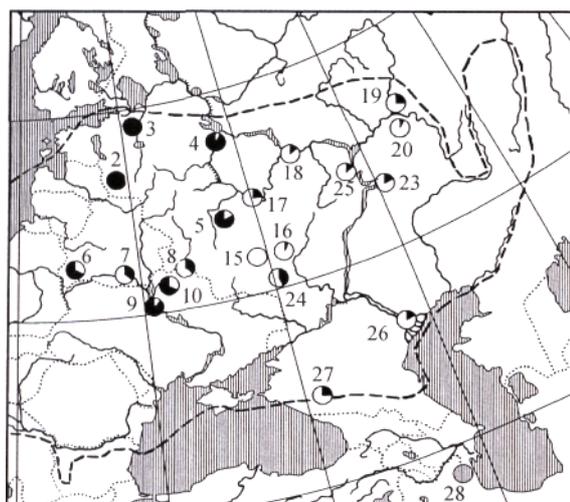


Рис. 1. Распределение аллелей диагностических локусов у двух форм *Pelobates fuscus*.

Цифрами (в соответствии с табл. 1) отмечены районы сбора: белый сектор — восточная форма, черный — западная. Штриховой линией обозначена граница ареала *Pelobates fuscus*, пунктирной — границы государств.

Fig. 1. Distribution of diagnostic loci alleles among two *Pelobates fuscus* forms.

While color is the eastern form, black — western form. By shaped line is designated the border of *Pelobates fuscus* areal, the dot line is for states borders.

мися к разным формам, варьировали от 0.055 до 0.563, в среднем 0.311.

Значения генетических дистанций между *P. fuscus* и *P. syriacus* колебались от 0.777 до 1.155, составляя в среднем 0.943. При этом средняя дистанция между западной формой *P. fuscus* и *P. syriacus* была равна 0.937

(0.777—1.047), а между восточной формой и *P. syriacus* — 0.948 (0.846—1.155).

На рис. 3 представлена UPGMA-дендрограмма, отражающая генетические отношения между всеми изученными выборками. Резко обособлена ветвь, представленная *P. syriacus*. Популяции *P. fuscus* отчетливо разделяются на два кластера. В первый кластер входят выборки из Ленинградской, Ярославской, Псковской, Тульской, Черниговской, Брестской и Киевской областей. По размеру генома все они были идентифицированы как западная форма. Во втором кластере находятся преимущественно выборки, относящиеся к восточной форме. Лишь две выборки, относящиеся к западной форме (Сумская и Гомельская области) и характеризующиеся преобладанием чужих аллелей, находятся в одном кластере с выборками восточной формы. В этом кластере выборки из Астраханской обл., Башкортостана и Ставропольского края образуют отдельный субкластер.

### Обсуждение

Генетические дистанции и проблема вида. Для того чтобы оценить полученные нами результаты, прежде всего, необходимо проанализировать значения генетических дистанций между близкородственными видами у амфибий и в других группах животных.

Считается общепринятым, что генетические дистанции, подсчитанные по биохимическим локусам, отражают эволюционные отношения между изучаемыми популяциями и дают ориентировочные оценки времени их дивергенции. Полагают также, что эти дистанции коррелируют с таксономическим рангом сравниваемых популяций. Действительно, анализ более чем 8000 генетических дистанций (Nei, 1972), подсчитанных в разных группах растений и животных, показал, что в 98 % слу-

Таблица 2

#### Тканеспецифичность проявления исследованных ферментов и локусов в различных буферных системах

Ферменты	Номер <sup>а</sup>	Локус	Ткань	Буфер
Аспаргатаминотрансфераза	2.6.1.1	sAAT-1, 2	M <sup>б</sup>	A, B <sup>д,г</sup>
Аспаргатаминотрансферазаподобный белок	—	AAT-L	M	B
Креатинкиназа	2.7.3.2	CK	M	A
Эстераза	3.1.1.-	EST-1	M	A
Глютаматдегидрогеназа	1.4.1.2	GLUD-1, 2, 3	M, L <sup>д</sup>	C <sup>е</sup>
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	1.1.1.8	GPDH-1, 2	M	A, B
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	1.1.1.49	G6PD-1, 2	L	A
L-Идитолдегидрогеназа	1.1.1.14	IDDH-1, 2	M, L	C, A
Изоцитратдегидрогеназа	1.1.1.42	IDH-1	L	D <sup>ж</sup>
Лактатдегидрогеназа	1.1.1.27	LDH-1, 2	M	B
Малатдегидрогеназа	1.1.1.37	sMDH-1, 2	L	A
Супероксиддисмутаза	1.15.1.1	SOD-1	L	A
Фосфоглюкомутаза	5.4.2.2	PGM	L	C
Фосфоглюконатдегидрогеназа	1.1.1.44	PGDH-1, 2	L	A

<sup>а</sup> Номер согласно номенклатуре IUBNC (1984). <sup>б</sup> Мышцы. <sup>в,г,е,ж</sup> Буферные растворы: <sup>б</sup> Трис—ЭДТА—Na<sub>2</sub>-борат, pH 8.4 (гелевый и электродный); <sup>г</sup> Трис-цитрат, pH 8.0 (гелевый) и Трис—ЭДТА—Na<sub>2</sub>-борат, pH 8.4 (электродный); <sup>е</sup> Трис-HCl, pH 8.9 (гелевый) и Трис-глицин, pH 8.3 (электродный); <sup>ж</sup> Трис-цитрат, pH 7.0 (гелевый и электродный). <sup>д</sup> Печень.

Таблица 3

Частоты аллелей у *Pelobates fuscus* и *P. syriacus*, средняя ожидаемая гетерозиготность (H) и доля аллелей *P. fuscus* западной формы

Локус	Аллель	Pelobates fuscus, западная форма <sup>a</sup>									<i>P. syriacus</i> <sup>a</sup>
		2(18)	3(1)	4(1)	5(4)	6(3)	7(10)	8(7)	9(1)	10(9)	
sAAT-1	a	1.00	1.00	1.00	0.63	1.00	0.90	1.00	1.00	0.90	1.00
	b				0.37		0.10			0.10	
sAAT-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	b										1.00
AAT-L	a						0.95	0.14	1.00	0.10	1.00
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.05	0.86		0.90	
CK	a						0.90	0.86	1.00	0.17	1.00
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.10	0.14		0.83	
EST-1	a	0.94	1.00	0.50	0.75	0.50	0.10	0.14	1.00	0.50	1.00
	b	0.06		0.50	0.25	0.50	0.90	0.86		0.50	
GLUD-1	a	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.45		1.00	0.33	—
	b					0.50	0.55	1.00		0.67	
GLUD-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.93	1.00	1.00	1.00
	b							0.07			
GLUD-3	a	1.00	1.00	1.00	1.00	0.33	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00
	b					0.67				0.50	
GPDH-1	a			1.00	1.00		0.25	0.14	1.00	0.94	
	b	1.00	1.00			1.00	0.75	0.86		0.06	1.00
GPDH-2	a				0.13	0.33	0.40	0.57	1.00	0.15	
	b	1.00	1.00	1.00	0.88	0.67	0.60	0.43		0.85	
	c										1.00
G6PD-1	a	1.00	1.00	1.00	0.63	0.83	0.50	0.07	1.00	0.45	0.13
	b				0.38	0.17	0.50	0.93		0.55	0.25
	c										0.63
G6PD-2	a	0.31	0.50		0.13	0.67	0.45	0.71	1.00	0.25	
	b	0.69	0.50	1.00	0.88	0.33	0.55	0.29		0.75	
	c										
IDDH-1	a					0.83	0.90	1.00	1.00	0.35	
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	0.17	0.10			0.65	1.00
IDDH-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
	b										1.00
IDH-1	a	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	b					0.33					
LDH-1	a	0.03				0.83	0.85	0.92		0.10	
	b	0.97	1.00	1.00	1.00	0.17	0.15	0.08	1.00	0.90	
	c										0.50
	d										0.50
LDH-2	a										1.00
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
sMDH-2	a	0.50	1.00	1.00	0.75	0.50	0.45	0.57	1.00	0.50	
	b	0.50			0.25	0.50	0.55	0.43		0.50	0.50
	c										0.50
SOD-I	a										1.00
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	
	c									0.25	
	a	0.15			0.25	0.67	0.15	0.71	0.50	0.40	
PGDH-1	b	0.60	0.50	0.50	0.75	0.33	0.50	0.29	0.50	0.30	
	c	0.25	0.50	0.50			0.35			0.30	
	d										1.00
H		0.074	0.087	0.087	0.124	0.238	0.207	0.150	0.043	0.259	0.083
Зан, %		98	100	90	80	67	36	37	83	69	—

Таблица 3 (продолжение)

Локус	Аллель	Pelobates fuscus, восточная форма <sup>a</sup>										
		15(3)	16(14)	17(2)	18(9)	19(15)	20(5)	23(4)	24(32)	25(9)	26(1)	27(1)
sAAT-1	a			0.75		0.57			0.95			
	b	1.00	1.00	0.25	1.00	0.43	1.00	1.00	0.05	1.00	1.00	1.00
sAAT-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	b											
AAT-L	a	1.00	1.00	1.00	0.83	1.00	1.00	1.00	0.79	1.00	1.00	1.00
	b				0.17				0.21			
CK	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	0.50	1.00
	b									0.06	0.50	
EST-1	a				0.07	0.15		0.13	0.11	0.06		
	b	1.00	1.00	1.00	0.93	0.85	1.00	0.88	0.89	0.94	1.00	1.00
GLUD-1	a		0.14				0.10	0.50		0.39	0.50	1.00
	b	1.00	0.86	1.00	1.00	1.00	0.90	0.50	1.00	0.61	0.50	
GLUD-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	b											
GLUD-3	a	0.83	0.96	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50
	b	0.17	0.04									0.50
GPDH-1	a		0.89	1.00	0.88	1.00	0.70	0.25	1.00	0.78	1.00	
	b	1.00	0.11		0.13		0.30	0.75		0.22		1.00
GPDH-2	a	0.33	0.46			0.04	0.90	0.13		0.28	1.00	0.50
	b	0.67	0.54	1.00	1.00	0.96	0.10	0.88	1.00	0.72		0.50
	c											
G6PD-1	a					0.28		0.25		0.28	0.50	
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	0.72	1.00	0.75	1.00	0.72	0.50	1.00
	c											
G6PD-2	a	0.17	0.25	0.50	0.63	0.41	0.10	0.38	0.92	0.39		
	b	0.83	0.75	0.50	0.38	0.59	0.90	0.63	0.08	0.61	1.00	1.00
	c											
IDDH-1	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00		1.00	1.00	0.83	1.00	
	b						1.00			0.17		1.00
IDDH-2	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	b											
IDH-1	a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	1.00
	b									0.06		
LDH-1	a	1.00	0.61	1.00	0.61	0.97	0.60	1.00	0.17	1.00	1.00	0.50
	b		0.39		0.39	0.03	0.40		0.83			0.50
	c											
	d											
LDH-2	a											
	b	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
sMDH-2	a	0.50	0.50		0.50	0.50	0.10	0.50	0.31	0.67	1.00	0.50
	b	0.50	0.50	1.00	0.50	0.50	0.90	0.50	0.69	0.33		0.50
	c											
SOD-1	a			0.25					0.25			
	b	1.00	0.96	0.75	1.00	1.00	1.00	1.00	0.63	1.00	1.00	1.00
	c		0.04						0.13			
PGDH-1	a				0.42			0.25	0.59	0.17	0.50	0.50
	b	0.33	0.18	0.50	0.42	1.00	0.10	0.63	0.41	0.50	0.50	0.50
	c	0.67	0.82	0.50	0.17		0.90	0.13		0.33		
	d											
H		0.101	0.122	0.130	0.129	0.104	0.087	0.158	0.113	0.172	0.174	0.217
Зап, <sup>6</sup> %		0	9	22	13	25	8	15	43	12	17	25

<sup>a</sup> В скобках — число исследованных особей; номера соответствуют районам сбора в табл. I. <sup>6</sup> Доли аллелей западной формы (Зап) определены по 4—6 полудиапюстическим локусам.



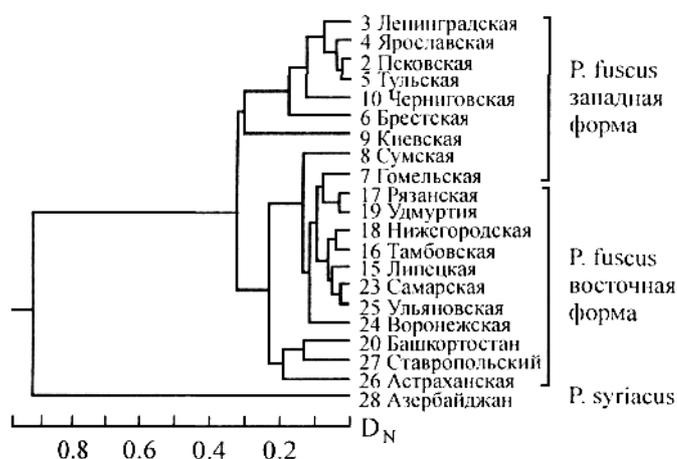


Рис. 3. UPGMA-дендрограмма генетического сходства между популяциями *Pelobates fuscus*.  
 $D_N$  — генетическая дистанция.

Fig. 3. UPGMA-dendrogram of genetic similarity between populations of *Pelobates fuscus*.  
 $D_N$  — genetic distance.

вативность. Полагают, что именно высокая скорость хромосомной эволюции вместе с особенностями строения обеспечивают значительно более высокие темпы видообразования у млекопитающих по сравнению с низшими позвоночными (Bush et al., 1977). Иммунологические дистанции между видами амфибий значительно больше, чем между видами млекопитающих (Wallace et al., 1973).

С учетом специфики амфибий как группы животных, виды которой в среднем наиболее генетически различны (наряду с видами дрозофил), необходимо сопоставить полученные нами данные с уже известными именно для этого класса позвоночных. Анализ 510 генетических дистанций между видами амфибий показал, что они варьировали примерно между 0.1 и 3.0 (Avice, Aquadro, 1982). Однако недавно между двумя видами южноамериканских бесхвостых амфибий рода *Batrachophryne* (*Leptodactylidae*) обнаружили еще меньшее значение, равное 0.03 (Sinsch, Juraske, 1995). В табл. 5 приведены дополнительные данные по генетическим дистанциям в разных группах амфибий. В нее включены преимущественно только те работы, в которых было использовано не менее 20 локусов. Как видно, в целом эти данные, колеблясь от 0.03 до 4.50, подтверждают выводы, сделанные ранее.

Несмотря на такой большой разброс значений, все же можно видеть определенное соответствие между величиной генетической дистанции и эволюционным статусом популяций. В пределах каждой из эволюционных линий различия между популяциями в среднем ниже, чем между разными видами (табл. 5), хотя они могут и перекрываться. Тем не менее теоретически нельзя обосновать, с какого порога те или иные значения генетических дистанций будут указывать, например, на то, следует ли сравниваемые популяции считать разными видами или нет (Frost, Hillis, 1990; Veith, 1996).

Широкий диапазон различий между собственно видами, скорее всего, отражает разный уровень их дивергенции. Определяя статус популяций, важно учитывать те аспекты, которые могут указывать на генетическое взаимодействие этих популяций (или его отсутствие).

Ими в первую очередь являются особенности распространения, которые распадаются на три главные категории: 1) хотя бы частичное перекрывание ареалов, или симпатрия; 2) их соприкосновение с образованием узкой контактной зоны, или парапатрия; 3) полное географическое обособление, или аллопатрия. Отсутствие генетического потока между симпатрическими или парапатрическими популяциями или же наличие ограниченной гибридизации с пониженной жизнеспособностью (и фертильностью) гибридов будет говорить в пользу генетической обособленности сравниваемых популяций и, следовательно, об их принадлежности к разным видам.

Гораздо сложнее ситуация с аллопатрическими популяциями. Некоторые эволюционисты полагают, что признание этим популяциям видового статуса только на основе некоего стандарта генетических дистанций привело бы к хаосу в систематике (Wake, 1981). С другой стороны, пренебрегать такими данными также было бы неправильно (Highton, 1989, 1990).

Необходимо отметить, что оживленная дискуссия о значении генетических дистанций, получаемых при использовании аллозимов, в еще большей степени важна в отношении других молекулярных методов, которые находят все большее применение в изучении видообразования и в эволюционной систематике за последнее десятилетие. Например, применение метода секвенирования позволяет найти различия даже между отдельными особями, а не только между популяциями и видами. Будучи весьма важным инструментом для выявления линий эволюционного развития как внутри вида («микрорифология»), так и между видами, тем не менее сам по себе этот подход в настоящее время еще менее интуитивен в отношении границ вида по сравнению с более традиционным аллозимным анализом.

Большое влияние на решение проблемы определения границ вида (вид или подвида) оказывают теоретические взгляды, которых придерживается тот или иной исследователь (см.: Gollman, 1996; De Queiroz, 1998, 1999; Neu, 2001). Наиболее архаичной следует считать так называемую типологическую концепцию вида, иногда неточно называемую морфологической, согласно которой виды определяются степенью различий. Хотя эта концепция, ранее широко распространенная среди эволюционистов и систематиков, работавших с морфологическими признаками, сейчас почти всеми отвергнута, тем не менее ее отражение можно найти в желании молекулярных биологов установить некие стандарты различий («пороги дистанций»), начиная с которых ту или иную популяцию можно считать самостоятельным видом. Наибольшее распространение в последние десятилетия имела (и имеет) так называемая биологическая концепция вида (Майр, 1968), согласно которой виды определяются не различиями, а генетической изоляцией (обособленностью). Именно в рамках этой концепции получили свое широчайшее применение цитогенетические и биохимические (аллозимные) исследования процессов видообразования.

В последние годы эта концепция вытесняется так называемой эволюционной концепцией вида (см.: Wiley, 1978; Frost, Hillis, 1990), согласно которой виды — это независимые траектории эволюционного развития популяций. Иначе говоря, каждый вид эволюционирует независимо от других и имеет свою собственную эволюционную судьбу. Все более широкому распространению

Генетические дистанции (Nei, 1972, 1975) между популяциями, подвидами и видами у амфибий

Группа <sup>a</sup>	N <sup>b</sup>	Генетическая дистанция			Литературный источник
		популяции	подвиды	виды	
<b>Ambystomatidae</b>					
Ambystoma (2)	29—32	0.03—0.39	—	0.40—0.42	Shaffer, 1983
<b>Bufo nidae</b>					
Bufo viridis group (2 [2n])	22	0.03	0.04—0.07	0.77—0.94	Межжерин, Писанец, 1995
<b>Discoglossidae</b>					
Alytes (4)	31—50	0.01—0.08	0.05—0.22	0.22—1.06	Arntzen, Garcia-Paris, 1995
Discoglossus (3)	35	0.00—0.02	0.07—0.08	0.38—1.12	Lanza et al., 1984
<b>Hylidae</b>					
Hyla arborea group (3)	26	0.01—0.20	—	0.60—1.36	Nishioka et al., 1990
<b>Leptodactylidae</b>					
Batrachophrynus (2)	23	—	—	0.03	Sinsch, Juraske, 1995
Telmatobius (2)	23	0.02—0.07	—	0.11—0.14	То же
Telmatobius (4)	23	—	—	0.34—0.92	» »
<b>Myobatrachidae</b>					
«Ranidella» [Crinia] (2)	26	0.01—0.29	—	1.10—1.29	Odendaal et al., 1983
<b>Pelobatidae</b>					
Pelobates (2)	21	0.02—0.39	—	0.78—1.16	Наши данные
<b>Ranidae</b>					
Rana (7)	20	0.16	—	0.35—1.59	Case, 1978
R. nigromaculata complex (3)	26	0.03—0.18	0.08—0.48	0.29—0.84	Nishioka, Sumida, 1992
R. temporaria group (1 1)	25	0.01—0.18	—	0.26—1.40	То же
R. temporaria group (3)	26	0.00—0.01	—	0.26—0.70	Межжерин и др., 1997
<b>Plethodontidae</b>					
Ancides flavipunctatus (1)	21	0.02—0.22	—	—	Larson, 1980
Bolitoglossa (8)	18	0.02—0.63	—	0.25—2.30	Hanken, Wake, 1982
B. franklini group (4)	17	0.12—0.32	0.20—0.30	0.13—1.80	Wake, Lynch, 1982
Ensantina eschscholtzii (1)	29	0.01—0.57	0.16—0.67	—	Jackman, Wake, 1994
Hydromantes (5)	19	0.00—0.28	—	0.12—1.84	Wake et al., 1978
Hydromantes (7)	33	0.00—0.18	—	0.33—2.72	Nascetti et al., 1996
Plethodon (26)	29	—	—	0.17—4.50	Highton, Larson, 1979
Plethodon (4)	23	0.00—0.28	—	0.18—0.57	Duncan, Highton, 1979
P. glutinosus group (4)	22	0.00—0.43	—	0.28—0.67	Highton, Macgregor, 1983
P. welleri group (3)	26	0.00—0.29	0.15—0.46	0.31—2.15	Larson, Highton, 1978
Pseudoeurycea (4)	18	0.00—0.54	—	0.15—2.02	Lynch et al., 1983
Thorius (9)	16	0.06—0.58	0.39	0.18—2.07	Hanken, 1983
<b>Proteidae</b>					
Necturus (3)	17	—	—	0.34—0.44	Aston et al., 1980
Necturus (5)	19	0.01—0.29	—	0.30—0.64	Guttman et al., 1990
Proteus anguinus (1)	40	0.14—0.56	0.23—0.24	—	Sket, Arntzen, 1994
<b>Salamandridae</b>					
Salamandra (4)	33	0.00—0.14	0.10—0.40	0.50—0.94	Veith, 1994
Triturus (9)	19	—	—	0.41—2.00	Rafinski, Arntzen, 1987
Triturus (7)	22	—	0.11—0.49	0.38—1.51	Macgregor et al., 1990
Triturus (6)	26	—	—	0.20—1.60	Межжерин и др., 1998

Таблица 5 (продолжение)

Группа <sup>а</sup>	N <sup>б</sup>	Генетическая дистанция			Литературный источник
		популяции	подвиды	виды	
<i>T. alpestris</i> (1)	35	0.00—0.22	0.15—0.27	—	Arano et al., 1991
<i>T. cristatus</i> group (5)	16	0.00	—	0.36—1.10	Litvinchuk et al., 1994
<i>T. italicus</i> (1)	23	0—0.19	—	—	Ragghianti, Wake, 1986
<i>T. vittatus</i> (1)	36	—	0.18—0.58	—	Arntzen, Olgun, 2000
<i>T. vulgaris</i> (1)	22	—	0.05—0.14	—	Kalezic, 1984

<sup>а</sup> В скобках указано количество видов. <sup>б</sup> Количество исследованных локусов.

именно этой концепции способствуют новые цитогенетические и особенно молекулярные методы (например, секвенирование), выявляющие родственные линии эволюционного развития как на уровне групп популяций, так и на уровне групп видов. Таким образом, имеется некоторая корреляция между развитием той или иной концепции вида и применяемыми методами.

Основываясь на эмпирических данных, некоторые авторы, работающие с амфибиями, полагают, что при достижении 15% генетических различий (когда  $D_N = 0.15$  и выше) сравниваемые выборки следует относить к разным видам (Highton, 1989, 1990). Однако, например, в роде *Salamandra* виды различаются при значениях генетической дистанции в среднем выше 0.5, а подвиды — соответственно ниже 0.5 (Veith, 1996). Этим же автором было проведено сопоставление усредненных межвидовых дистанций в нескольких родах европейских амфибий и выявлено, что они варьировали от 0.4 до 1.2. Наши данные по двум видам рода *Pelobates* хорошо укладываются в этот диапазон. Так, значения генетической дистанции между *P. fuscus* (обе формы) и *P. syriacus* были равны 0.777—1.155, составляя в среднем 0.943. Однако различия между двумя криптическими формами *P. fuscus* оказались ниже, варьируя от 0.055 до 0.563 (в среднем 0.311), что тем не менее соответствует нижним значениям генетических различий между обычными видами в ряде родов амфибий из разных семейств (табл. 5).

На наш взгляд, при анализе биохимических данных следует учитывать не только значение генетических дистанций между популяциями, но и их иерархию и географическое структурирование. Так, например, в двух работах по изучению генетической дифференциации в роде *Discamptodon* были четко выявлены криптические группировки (виды), хотя сами значения дистанций различались (Daugherty et al., 1983; Good, 1989).

Генетические дистанции между криптическими видами у амфибий и проблема морфологического статуса. Применение биохимических, цитогенетических и биоакустических методов позволило выявить криптические виды во многих группах амфибий (см., например: Blackwell, 1978; Larson, Highton, 1978; Highton, Larson, 1979; Wake, 1981; Turner, Heppich, 1982; Daugherty et al., 1983; Hanken, 1983; Highton, Macgregor, 1983; Lanza et al., 1984; Busack, 1986; Guttman, Karlin, 1986; Karlin, Guttman, 1986; Good, 1989; Beerli, 1994; Beerli et al., 1994, 1996; Sinsch, Eblenkamp, 1994; Arntzen, Garcia-Paris, 1995; Nascetti et al., 1995), в том числе и на территории бывшего СССР, в частности в Таджикистане (Межжерин,

Писанец, 1991; Межжерин, 1992; Писанец и др., 1996). Возникает вопрос: отличаются ли значения генетических дистанций у криптических видов амфибий от таковых у обычных, морфологически хорошо различимых видов?

В табл. 6. представлены данные по криптическим видам из разных семейств амфибий. Как видно, генетические дистанции варьируют от 0.02 до 2.15. Если же взять данные по разным классам позвоночных и дрозофиле (Воронцов, 1999), то их разброс составит от 0.012 у некоторых птиц до 1.16 у полевок. Таким образом, значения генетических дистанций у криптических видов вполне укладываются в пределы, известные для обычных видов. Однако следует отметить, что, хотя по нижним значениям генетических различий у амфибий криптические виды не отличаются от обычных близкородственных видов (в среднем  $D_N = 0.29$ ), в среднем генетически они менее отличаются друг от друга, чем виды, хорошо различающиеся морфологически.

Большой разброс генетических дистанций среди криптических видов можно объяснить наличием двух разных категорий этих видов, которые должны заметно различаться по степени генетической дивергенции. Во-первых, это так называемые сестринские виды, которые появились в результате расщепления одного и того же предкового вида. Поэтому их морфологическое сходство имеет первичный характер. Во-вторых, это виды, которые не являются ближайшими родственниками и у которых морфологическое сходство вторично. Первую категорию криптических видов можно называть видами-близнецами, а вторую — видами-двойниками (см.: Тимофеев-Ресовский и др., 1969).

Механизмы генетической дифференциации у криптических видов в отношении биохимических локусов, вероятно, не отличаются от таковых у обычных видов. Во всяком случае, как и у последних, у криптических видов также наблюдается корреляция уровня генетических дистанций с эволюционным статусом. Так, дистанции между популяциями в пределах криптического вида в среднем явно меньше, чем между самими видами. Например, генетические дистанции между популяциями *Rana bedriagae* в Израиле колеблются в пределах 0.006—0.056 (в среднем 0.028) (Nevo, Yang, 1982), а между популяциями *R. kurtmuelleri* в Греции — в пределах 0.00—0.02 (Hotz, Uzzell, 1982), тогда как между самими видами  $D_N = 0.196—0.247$  (Nevo, Filippucci, 1988; Sinsch, Eblenkamp, 1994). Оба эти криптических вида ранее относили к озерной лягушке *Rana ridibunda*, от которой они отличаются голосовыми реакциями и биохимически, но не внешним обликом.

Таблица 6

Генетические дистанции  $D_N$  между криптическими видами у амфибий

Сравниваемые виды	N <sup>a</sup>	$D_N$	Литературный источник
Bufonidae			
Bufo viridis — B. shaartusiensis	23	0.29	Межжерин, Писанец, 1991
Discoglossidae			
Alytes obstetricans — A. duckhilleni	31—50	0.31 (0.22—0.38)	Arntzen, Garcia- Paris, 1995
Discoglossus montalentii — D. pictus	35	1.06 (1.01—1.12)	Lanza et al., 1984
Dicamptodontidae			
Dicamptodon (3 вида)	34	0.08—0.64	Daugherty et al., 1983
Dicamptodon (4 вида)	31	0.39—0.98	Good, 1989 <sup>B</sup>
Hylidae			
Hyla arborea — H. intermedia	28	0.47	Nascetti et al., 1995
H. chrysoscelis (2n) — H. versicolor (4n)	20	0.02—0.20	Ralin et al., 1983
Myobatrachidae			
Ranidella insignifera — R. pseudinsignifera	10	0.18	Blackwell, 1978
Pelobatidae			
Pelobates cultripes — P. varaldii	32	0.79	Busack et al., 1985 <sup>B</sup>
P. fuscus (запад — восток)	23	0.31 (0.05—0.56)	Данные авторов
Plethodontidae			
Desmognathus fuscus — D. sp.	21	0.17—0.63	Karlin, Guttman, 1986 <sup>B</sup>
D. ochrophaeus — D. sp.	17	0.20—0.22	То же
D. ochrophaeus — D. imitator	23	0.53	Tilley et al., 1978
Plethodon idahoensis — P. vandykei	29	0.35	Highton, Larson, 1979
P. kentucki — P. glutinosus	22	0.45 (0.33—0.60)	Highton, Mac Gregor, 1983
Ranidae			
Rana ridibunda — R. terentievi	31	0.21—0.29	Межжерин, Песков, 1992
R. bedriagae — R. kurtmuelleri	41	0.25	Nevo, Filippucci, 1988 <sup>Г</sup>
R. bedriagae — R. kurtmuelleri	20	0.20	Sinsch, Eblenkamp, 1994 <sup>Г</sup>
R. bedriagae — R. ridibunda	20	0.18	То же
R. ridibunda — R. kurtmuelleri	20	0.18	» »
Rhyacotritonidae			
Rhyacotriton (4 вида)	29	0.24—1.17	Good, Wake, 1992 <sup>B</sup>
Salamandridae			
Salamandra atra — S. lanzai	30	0.74 (0.71—0.76)	Nascetti et al., 1988 <sup>B</sup>

<sup>a</sup> Количество исследованных локусов. <sup>b</sup> Среднее и(или) пределы. <sup>B</sup>Приведена генетическая дистанция с поправкой на смещение (Nei, 1978). <sup>Г</sup> Названия амфибий из Европы и Азии приведены в соответствии со списком Боркина (Borkin, 1999).

Эта закономерность прослеживается и у *Pelobates fuscus*: генетические дистанции между популяциями в пределах западной ( $D_N = 0.023—0.388$ , в среднем 0.202) или в пределах восточной ( $D_N = 0.021—0.317$ , в среднем 0.119) формы были ниже, чем между самими этими формами ( $D_N = 0.055—0.563$ , в среднем 0.311). Таким образом, криптическое видообразование связано не с более быстрой (опережающей) генетической дифференциацией популяций по биохимическим признакам, а скорее с сохранением внешнего облика (морфотипа) животных.

Проблема морфологического стазиса, т. е. сохранения морфологического облика в ходе эволюции (Wake

et al., 1983), относится к числу наиболее сложных в эволюционной биологии. Казалось бы, в изменяющихся условиях под воздействием естественного отбора виды, адаптируясь, должны претерпевать определенные морфологические изменения, что и наблюдается в большинстве случаев. Тем не менее в ряде групп животных интенсивное видообразование не сопровождается заметными изменениями в морфологии. Например, североамериканские безлегочные саламандры рода *Plethodon* представлены множеством видов. Отдельные виды этого хорошо изученного рода сходны морфологически, хотя они значительно различаются по размеру генома, генетическим и иммунологическим дистанциям. По мнению

ряда авторов (Wake et al., 1983), саламандры рода *Plethodon* обладают генерализованной морфологией, которую можно рассматривать как надвидовую адаптацию. Стабильность такой морфологической системы, существующей на протяжении 60 млн лет, компенсируется пластичностью в поведении, экологии и онтогенезе, что позволяет организмам адаптироваться к изменениям в условиях среды без серьезного изменения морфологии. Учитывая тот факт, что виды рода *Plethodon* немного различаются по величине и пропорциям тела, а также по окраске, лучше говорить об относительном стазисе (Wake et al., 1983).

Проблема морфологического стазиса прямо относится к чесночницам рода *Pelobates*. Хотя этот род немногочислен и насчитывает всего 4 вида, для него очень характерна консервативность внешнего облика. Если к тому же учесть, что имеется удивительное морфологическое сходство между чесночницами (*Pelobates*) и лопатоногами Северной Америки (*Scaphiopus*), то морфологический стазис существует в сем. *Pelobatidae*, по молекулярным оценкам, не менее 75—150 млн лет (Sage et al., 1982; Busack et al., 1985). Однако вряд ли изложенная выше гипотеза (Wake et al., 1983) приложима к чесночницам. В отличие от саламандр рода *Plethodon* с генерализованной морфологией чесночницы рода *Pelobates* представляют собой пример явной специализации к роющему и скрытному образу жизни, преимущественно обитая в своих убежищах, закапываясь в мягкий грунт или живя в норах. Таким образом, как морфологические особенности, так и образ жизни у *Pelobates* весьма специализированы. Скорее морфологический стазис у чесночниц можно объяснить с помощью стабилизирующего отбора (Шмальгаузен, 1968), который поддерживает (сохраняет) «оптимальный фенотип», выработанный у чесночниц в ходе их адаптации к роющему, скрытному образу жизни.

Криптическое видообразование у *P. fuscus*. Генетическая изменчивость у представителей рода *Pelobates* изучена крайне слабо. Известна лишь одна работа, в которой было проведено сравнение аллозимных спектров у представителей этого рода. Авторы (Busack et al., 1985) сопоставили марокканскую (*P. varaldii*) и испанскую (*P. cultripes*) чесночниц по 32 локусам. Генетическая дистанция между этими морфологически весьма сходными видами, живущими на разные стороны Гибралтарского пролива, оказалась равной 0.791, т.е. в 2.5 раза больше, чем между двумя формами *P. fuscus*, но ниже, чем между *P. fuscus* и *P. syriacus* ( $D_N = 0.943$ ). Тем не менее ясно, что криптические формы *P. fuscus* генетически менее дифференцированы, чем упомянутые морфологически сходные виды.

Сравнение генетических дистанций между *P. cultripes* и *P. varaldii* (Busack et al., 1985) с геологическими событиями, приведшими к обособлению этих видов (появление Гибралтарского пролива), позволяет нам вычислить временной эквивалент одной единицы генетической дистанции  $D_N$  для представителей рода *Pelobates*. Исходя из постоянства молекулярных часов, т.е. не изменяющихся в ходе эволюции темпов замещения аминокислотных последовательностей за единицу геологического времени (что вполне вероятно для небольшого промежутка времени), он приблизительно равен 7 млн лет. Применяя этот временной эквивалент к генетическим различиям между западной и восточной формами *P. fuscus*, время их дивергенции можно оценить пример-

но в 2.2 млн лет. Вероятно, в этот период (конец плиоцена) сложились условия для географической изоляции между западными (Центральная Европа) и восточными (Северо-Каспийские низменности) предковыми популяциями этого вида.

Хотя многие виды современных амфибий Европы, судя по палеонтологическим данным, сформировались не позднее конца плиоцена (Боркин, 1984; Hewitt, 1996), тем не менее приращение обеим формам *P. fuscus* статуса полноценных криптических видов только на основании их плиоценового возраста было бы преждевременным. Наличие значительного количества «чужих» аллелей в некоторых популяциях каждой из этих форм явно свидетельствует о том, что существует (или существовала) контактная зона, в которой обе формы могли обмениваться генетическим материалом. Возможно, именно потоком генов между обеими формами и объясняются относительно невысокие значения генетической дистанции в пределах *P. fuscus* по сравнению с генетически (и географически) полностью изолированными *P. varaldii* и *P. cultripes*. Поэтому до изучения генетической картины у *P. fuscus* из центральной части Восточно-Европейской равнины делать какие-либо выводы об эволюционном (и таксономическом) статусе обеих форм (подвиды или виды) было бы преждевременно. Тем не менее уже сейчас можно сказать, что их морфологическое сходство имеет первичный характер, т.е. обе формы относятся к категории близнецов, а не двойников.

Сопоставление ДНК-цитометрического и аллозимного анализа. В последние десятилетия сопоставление различных методов, используемых при изучении видообразования, является одной из важных тем в эволюционной биологии. Во многом появление такой тематики было вызвано активным использованием молекулярно-биохимических и цитогенетических методов. Чаще всего обсуждались степень конгруэнтности (совпадения или несовпадения) наборов морфологических (пропорции тела, особенности анатомии и т.д.), цитогенетических (кариотипы) и биохимических (аллозимы, анализ последовательностей ДНК и т.д.) признаков, чему посвящено большое количество работ (Larson, Highton, 1978; Larson et al., 1981; Wake, 1981; Darda, 1994; Titus, Larson, 1996; Jackman et al., 1997; Canatella et al., 1998; Herrmann et al., 1999; Veith et al., 2001). В связи с тем что молекулярные исследования дали большое количество новых биохимических методов, появились также работы, сравнивающие их между собой. Выяснилось, что в ряде случаев эволюция ядерного и митохондриального геномов может происходить по-разному (Dowling, Brown, 1989; Lehman et al., 1991; McKnight et al., 1991; Babcock, Asmussen, 1996; Arnold, 1997; Rawson, Helbush, 1998; Litvinchuk et al., 1999; Mead et al., 2001). Наша работа представляет особый интерес в том отношении, что в ней впервые производится детальное сравнение одних и тех же географических выборок (и особей) одного и того же вида с помощью двух разных методов: проточной ДНК-цитометрии и более традиционного для популяционной генетики аллозимного анализа.

Полученные результаты в основном показывают совпадение данных. Действительно, анализ аллозимной изменчивости подтвердил разделение *P. fuscus* на две отчетливо различающиеся по размеру генома географические группы (Боркин и др., 2001; Borkin et al., 2001).

Из 20 изучаемых выборок практически все были отнесены к одной или другой группе, причем результаты, полученные разными методами, совпали. Только выборки из Сумской и Гомельской областей были идентифицированы по-разному. По размеру генома они были отнесены к западной форме, а по ферментным локусам - к восточной. Исходя из того, что обе эти выборки, по видимому, достаточно близки к зоне контакта ареалов этих форм (рис. 3), можно предположить, что это несоответствие (повышенное число чужих аллелей), обнаруженное у них, связано с гибридизацией между западной и восточной формами.

Необходимо отметить, что и аллозимный анализ, и проточная ДНК-цитометрия анализируют ядерную составляющую генома, но работают на разных уровнях. Считается, что статистически адекватный набор локусов (около 25) (Beerli, 1994) в достаточной мере дает оценку активной части генома. В то же время размер генома — это некая общая, интегрированная характеристика всего ядерного генома. Хотя точные причины внутривидовой изменчивости, как и различия между близкими видами, неясны, можно предполагать, что они вызваны изменениями в высокоповторяющейся части генома.

Достоинством аллозимного анализа является то, что он позволяет исследовать генетические взаимоотношения между видами (гибридизация и интрогрессия генов), и данные, полученные с помощью этого анализа, могут полностью изменить представление о структуре гибридных зон, построенное на изучении только внешних признаков. Кроме того, наследование большинства из аллозимных признаков по кодоминантному типу позволяет устанавливать гибридный статус практически каждой особи ( $F_1$ , бэккросс и т.д.). В целом генетика этих признаков понятна, хотя иногда и нуждается в уточнении.

Совсем иная ситуация с размером генома. К сожалению, практически нет работ, которые четко показывали бы, как меняется размер генома при гибридизации, в частности у гибридных особей разного типа. Имеющиеся единичные исследования с использованием лабораторных гибридов обнаружили некоторое несоответствие между получаемыми и ожидаемыми данными, например, у бэккроссов (Литвинчук и др., 2001). Поэтому можно ожидать, что в зонах гибридизации и сильной интрогрессии генов (большое число чужих аллелей) ДНК-цитометрические данные могут не полностью вскрывать их тонкую генетическую структуру, что, например, было отмечено нами при изучении гибридизации между жерлянками *Bombina bombina* и *B. variegata* в Закарпатской обл. Украины (Халтурин и др., 2000, 2001).

Резюмируя результаты работы, отметим, что методом электрофореза белков была выявлена значительная генетическая дифференциация между двумя географическими группами *R. fuscus*, различающимися по размеру генома. Учитывая отсутствие морфологических различий между ними, мы можем утверждать, что в данном случае речь идет о первом случае криптического видообразования среди амфибий на востоке Европы.

Мы искренне благодарны Т. Г. Айдынову (Баку), Т.Р.Алиеву (Баку), А. В. Барабапову (Санкт-Петербург), А. Г. Борисовскому (Ижевск), О. М. Даниловой (Тамбов), Л. К. Йогансен (Санкт-Петербург), И. М. Коцержинской (Киев), Г.А.Ладе (Тамбов), Л. Ф. Литвинчук (Санкт-Петербург), Е. Б. Малашичеву (Санкт-Петербург),

Р.В.Новицкому (Минск), М.В.Пестову (Нижегний Новгород), К. А. Пурмак (Ставрополь), А. Б. Ручину (Саранск), Д. В. Скоринову (Санкт-Петербург), М. Ф. Тертышникову (Ставрополь) и А. И. Файзулину (Тольятти) за помощь при проведении полевых работ и предоставление живых чесночниц для настоящего исследования.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 02-04-49631 и 02-04-63157) и Федеральной целевой программы «Интеграция» (проект Э-0121).

### Список литературы

- Боркин Л.Я. 1984. Европейско-дальневосточные разрывы ареалов у амфибий: новый анализ проблемы. В кн.: Экология и фаунистика амфибий и рептилий СССР и сопредельных стран. Тр. ЗИН АН СССР. 124:55—88.
- Боркин Л.Я. 1999. Проблема вида и видообразования у амфибий. В кн.: Методологические проблемы развития зоологии. Междунар. конф., посвященная 275-летию Российской академии наук: Тез. докл. СПб. 13—15.
- Боркин Л.Я., Литвинчук С. Н., Мильпо К. Д., Розанов К. М., Халтурин М. Д. 2001. Критическое видообразование у *Pelobates fuscus* (Amphibia, Pelobatidae): цитометрические биохимические доказательства. Докл. РАН. 376 (5): 707—709.
- Воронцов Н. Н. 1999. Развитие эволюционных идей в биологии. М.: УНЦ ДО МГУ, Прогресс-Традиция, АБФ. 639с.
- Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Боркин Л.Я., Халтурин М. Д., Тимофеев Б. И., Джужич Г., Калезич М. Л. 2001. Размер генома и проблемы систематики хвостатых земноводных (на примере Salamandridae и Hynobiidae). В кн.: Вопросы герпетологии. Пушино; М. 168—170.
- Майр Э. 1968. Зоологический вид и эволюция. М.: Мир. 597с.
- Майр Э. 1974. Популяция, виды, эволюция. М.: Мир. 460с.
- Межжерин С. В. 1992. Новый вид зеленых жаб *Rana terentievi* sp. nova (Amphibia, Ranidae) з південного Таджикистану. Допов. АН України, Київ, мат., прир., техн. науки. 5 : 150-153.
- Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю., Котенка Т. И., Пионтковская Е. А. 1998. Биохимическая генная дифференциация тритонов (Amphibia, Salamandridae, Triturus) фауны Украины. Допов. Нац. АН України, Київ, мат., прир., техн. науки. 1 : 193—197.
- Межжерин С. В., Песков В. Н. 1992. Биохимическая изменчивость и генетическая дифференциация популяций озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. Цитол. генет. (Киев) 26(1): 43—48.
- Межжерин С. В., Писанец Е. М. 1991. Генетическая дивергенция представителей комплекса зеленых жаб *Bufo viridis* complex фауны СССР. ДАН СССР. 317 (1) : 222—226.
- Межжерин С. В., Писанец Е. М. 1991. Генетическая структура и происхождение тетраплоидной жабы *Bufo danatensis* Pisanetz, 1978 (Amphibia, Bufonidae) Средней Азии, дифференциация географических форм и генетические связи диплоидных видов с тетраплоидным. Генетика. 31 (3) : 342-352.
- Писанец Е. М., Межжерин С. В., Щербак Н. Н. 1996. Исследования по гибридизации и внешней морфологии азиатских жаб (Amphibia: Bufonidae) и описание нового вида *Bufo shaartuensis* sp. nov. Допов. Нац. АН України, Київ, мат., прир., техн. науки. 6: 147—151.
- Серов О. Л., Корочкин Л. И., Манченко Г. П. 1977. Электрофоретические методы исследования изоферментов. В кн.: Генетика изоферментов. М.: Наука. 18—64.
- Тимофеев-Ресовский Н. В., Воронцов Н. Н., Яблоков А. В. 1969. Краткий очерк теории эволюции. М.: Наука. 407 с.

- Халтурин М. Д., Розанов Ю. М., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я. 2000. Сопоставление методов идентификации гибридных геномов в зонах межвидовых контактов. Цитология. 42(3): 314—315.
- Халтурин М. Д., Розанов Ю. М., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я. 2001. Гибридизация между жерлянками *Bombina bombina* и *B. variegata* в Закарпатье. В кн.: Вопросы герпетологии, Пушино; М. 168—170.
- Шмальгаузен И. И. 1968. Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора. 2-е изд. М.: Наука. 451 с.
- Azano B., Arntzen J.W., Herrero P., Garcia-Paris M. 1991. Genetic differentiation among Iberian populations of the Alpine newt, *Triturus alpestris*. Amphibia—Reptilia. 12 : 409—421.
- Arnold M. L. 1997. Natural Hybridization and Evolution. New York: Oxford. 315 p.
- Arntzen J. W., Garcia-Paris M. 1995. Morphological and allozyme studies of midwife toads (genus *Alytes*), including the description of two new taxa from Spain. Contr. Zool. (Amsterdam). 65 : 5—34.
- Arntzen J. W., Olgun K. 2000. Taxonomy of the banded newt, *Triturus vittatus*: morphological and allozyme data. Amphibia—Reptilia. 21 : 155—168.
- Aston R. E., Branswell A.L., Gunman S. I. 1980. Electrophoretic analysis of three species of *Necturus* (Amphibia: Proteidae), and the taxonomic status of *Necturus lewisi* (Brimley). Brimleyana. 4 : 43—46.
- Avise J. C., Aquadro C. F. 1982. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates. Patterns and correlations. In: Evolutionary Biology. New York; London: Plenum Press. 15 : 151—185.
- Babcock C. S., Asmussen M. A. 1996. Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear polymorphism and disequilibrium. Genetics. 144 : 839—853.
- Barabanov A. V., Borokin L. J., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M. 1998. On distribution of *Pelobates fuscus* and *P. syriacus* in Asia. In: Third Asia Herpetological Meeting, Almaty, 1—5 September 1998, Abstracts. 10.
- Beerli P. 1994. Genetic isolation and calibration of an average protein clock in western Palearctic water frogs of an Aegean region. PhD Thesis. Zurich. 92 p.
- Beerli P., Hotz H., Turner G., Heppich S., Uzzell T. 1994. Two new water frog species from the Aegean Islands Crete and Karpathos (Amphibia, Salenia, Ranidae). Notulae Naturae. 470 : 1—9.
- Blackwell J.M. 1978. Intra-specific divergence in the Western Australian frog *Raidella insignifera*. I. The evidence from gene frequencies and genetic distance. Heredity. 40 : 339—348.
- Borkin L. J. 1999. Distribution of amphibians in North Africa, Europe, Western Asia, and the former Soviet Union. In: Patterns of Distribution of Amphibians. A global perspective. Baltimore; London: The John Hopkins Univ. Press. 329—420.
- Borkin L. J., Caune I. A., Pisanetz E. M., Rozanov Y. M. 1986. Karyotype and genome size in the *Bufo viridis* group. In: Studies in Herpetology. Prague. 137—142.
- Borkin L. J., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Milto K. D. 2001. Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae): evidence from DNA flow cytometry. Amphibia—Reptilia. 22 : 387—396.
- Busack S.D. 1986. Biochemical and morphological differentiation in Spanish and Moroccan populations of *Discoglossus* and the description of a new species from southern Spain (Amphibia, Anura, Discoglossidae). Ann. Carnegie Mus. Nat. Hist. 55 : 41—61.
- Busack S.D., Maxon L.R., Wilson M. A. 1985. *Pelobates varaldii* (Anura: Pelobatidae): a morphologically conservative species. Copeia. 1985 : 107—112.
- Bush G. L., Case S. M., Wilson A. C., Potion J. L. 1977. Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74 : 3942—3946.
- Cannatella D. C., Hillis D. M., Chippindale P. T., Weigt L., Rand A. S., Ryan M. J. 1998. Phylogeny of frogs of the *Physalaemus pustulosus* species group, with an examination of data incongruence. Syst. Biol. 47 : 311—335.
- Case S. M. 1978. Biochemical systematics of members of the genus *Rana* native to western North America. Syst. Zool. 27 : 299—311.
- Cavalier-Smith T. 1985. Introduction: the evolutionary significance of genome size. In: The evolution of genome size. Chichester: John Wiley and Sons. 1—36.
- Darda D. M. 1994. Allozyme variation and morphological evolution among Mexican salamanders of the genus *Chiropterotriton* (Caudata: Plethodontidae). Herpetologica 50 : 164—187.
- Dougherty Ch. H., Allendorf F. W., Dunlap W. W., Knudsen K. L. 1983. Systematic implications of geographic patterns of genetic variation in the genus *Dicamptodon*. Copeia. 1983 : 679—691.
- De Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Endless forms: species and speciation. Oxford: Oxford Univ. Press. 57—75.
- De Queiroz K. 1999. The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. In: Species: new interdisciplinary essays. Cambridge: MIT Press. 49—89.
- Dowling T. E., Brown W. M. 1989. Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (Notropis: Cyprinidae). Syst. Zool. 38 : 152—158.
- Duncan R., Highton R. 1979. Genetic relationships of the eastern large Plethodon of the Ouachita mountains. Copeia. 1979 : 95—110.
- Frost D. R., Hillis D. M. 1990. Species in concept and practice: herpetological applications. Herpetologica. 46 : 87—104.
- Collman G. 1996. Species concepts: a contrast of viewpoints. Amphibia—Reptilia. 17 : 295—301.
- Good D. A. 1989. Hybridization and cryptic species in *Dicamptodon* (Caudata: Dicamptodontidae). Evolution. 43 : 728—744.
- Good D. A., Wake D. B. 1992. Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). Univ. Calif. Publ. Zool. 126 : 1—91.
- Guiller A., Bellido A., Madec L. 1998. Genetic distances and ordination: the land snail *Helix aspersa* in North Africa as a test case. Syst. Biol. 47 : 208—227.
- Gunman S. L., Karlin A.A. 1986. Hybridization of cryptic species of two-lined salamander (*Eurycea bislineata* complex). Copeia. 1986:96—108.
- Gunman S. L., Weigt L. A., Moler P.E., Ashton R.E., Mansell B. W., Peavy J. 1990. An electrophoretic analysis of *Necturus* from the southeastern United States. J. Herpetol. 24 : 163—175.
- Hanken J. 1983. Genetic variation in a dwarfed lineage, the Mexican salamander genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae): taxonomic, ecologic and evolutionary implications. Copeia. 1983 : 1051—1073.
- Hanken J., Wake D. B. 1982. Genetic differentiation among plethodontid salamanders (genus *Bolitoglossa*) in Central and South America: implications for the South American invasion. Herpetologica. 38 : 272—287.
- Herrmann H.-W., Joger U., Lenk P., Wink M. 1999. Morphological and molecular phylogenies of viperines: conflicting evidence. Kaupia, Darmstädter Beitr. Naturgesch. 8 : 21—30.
- Hewitt G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. Biol. J. Linn. Soc. 58 : 247—276.
- Hey J. 2001. The mind of the species problem. Trends Ecol. Evol. 16 : 326—329.
- Highton R. 1989. Biochemical evolution in the slimy salamanders of the *Plethodon glutinosus* complex in the eastern United States. In: Univ. Illinois Biol. Monograph. Springfield. 57 : 1—78.
- Highton R. 1990. Taxonomic treatment of genetically differentiated populations. Herpetologica. 46 : 114—121.
- Highton R., Larson A. 1979. The genetic relationships of the salamanders of the genus *Plethodon*. Syst. Zool. 28 : 579—599.
- Highton R., Mac Gregor J. R. 1983. *Plethodon kentucki* Mittleman: a valid species of Carnerland Plateau woldland salamander. Herpetologica. 39 : 189—200.

- Hotz H., Uzzell T. 1982. Biochemically detected sympatry of two water frog species: two different cases in the Adriatic Balkans (Amphibia, Ranidae). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 134:50—79.
- IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee). 1984. Enzyme nomenclature. Orlando, Florida: Acad. Press.
- Jackman T. R., Applebaum G., Wake D. B. 1997. Phylogenetic relationships of bolitoglossine salamanders: a demonstration of the effects of combining morphological and molecular data sets. Mol. Biol. Evol. 14:883—891.
- Jackman T. R., Wake D. B. 1994. Evolutionary and historical analysis of protein variation in the blotched forms of salamanders of the *Ensatina* complex (Amphibia: Plethodontidae). Evolution. 48: 876—897.
- Kalezis. M. L. 1984. Evolutionary divergences in the smooth newt, *Triturus vulgaris* (Urodela, Salamandridae): electrophoretic evidence. Amphibia—Reptilia. 5:221—230.
- Karlin A. A., Cullman S. I. 1986. Systematics and geographic isozyme variation in the plethodontid salamander *Desmognathus fuscus* (Rafinesque). Herpetologica. 42: 283—301.
- Lanza B., Nascetti G., Caputo V., Bullini L. 1984. Genetic relationships among west Mediterranean *Discoglossus* with the description of a new species (Amphibia, Salientia, Discoglossidae). Monitore Zool. Ital. N. S. 18: 133—152.
- Larson A. 1980. Paedomorphosis in relation to rates of morphological and molecular evolution in the salamander *Aneides flavipunctatus* (Amphibia, Plethodontidae). Evolution. 34: 1—17.
- Larson A., Highton R. 1978. Geographic protein variation and divergence in the salamanders of the *Plethodon welleri* group (Amphibia, Plethodontidae). Syst. Zool. 27:431—448.
- Larson A., Wake D. B., Maxson L. R., Highton R. 1981. A molecular phylogenetic perspective on the origins of morphological novelties in the salamanders of the tribe *Plethodontini* (Amphibia, Plethodontidae). Evolution. 35: 405—422.
- Lehman N., Eisenhower A., Han sen K., Mech L. D., Peterson O. R., Gogan P. J. P., Wayne R. K. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. Evolution. 45: 104—119.
- Licht L. E., Lowcock L. A. 1991. Genome size and metabolic rate in salamanders. Corp. Biochem. Physiol. 100B: 83—92.
- Litvinchuk S. N., Borkin L. J., Džukić G., Kalezic M. L., Khalaturin M. D., Rosanov J. M. 1999. Taxonomic status of *Triturus karelinii* on the Balkans, with some comments about other crested newt taxa. Russ. J. Herpetol. 6: 153—163.
- Litvinchuk S. N., Sokolova T. M., Borkin L. J. 1994. Biochemical differentiation of the crested newt (*Triturus cristatus* group) in the territory of the former USSR. Abh. Ber. Naturkunde, Mus. Naturk. Magdeburg. 17: 67—74.
- Lockwood S. F., Bickham J. W. 1992. Genome size in Beaufort Sea coastal assemblages of Arctic ciscoes. Trans. Amer. Fish. Soc. 121: 13—20.
- Lynch J. F., Wake D. B., Yang S. Y. 1983. Genie and morphological differentiation in Mexican *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae), with a description of a new species. Copeia. 1983: 884—894.
- Macgregor H. C., Sessions S. K., Arntzen J. W. 1990. An integrative analysis of phylogenetic relationships among newts of the genus *Triturus* (family Salamandridae), using comparative biochemistry, cytogenetics and reproductive interactions. J. Evol. Biol. 3: 329—373.
- Mazin A. L., Borkin L. J. 1979. Nuclear DNA content in green frogs of the genus *Rana*. Mitt. Zool. Mus. Berlin. 55:217—224.
- McKnight M. L., Dodd G. K., Spolsky Ch. M. 1991. Protein and mitochondrial DNA variation in the salamander *Phaeognathus hubrichti*. Herpetologica. 47: 440—447.
- Mead L. S., Tilley S. G., Katz L. A. 2001. Genetic structure of the blue ridge ducky salamander (*Desmognathus oresles*): inferences from allozymes, mitochondrial DNA, and behavior. Evolution. 55: 2287—2302.
- Nascetti G., Andreone F., Capula M., Bullini L. 1988. A new Salamandra species from southwestern Alps (Amphibia, Caudata, Salamandridae). Boll. Muz. Reg. Sci. Nat. Torino. 6:617—638.
- Nascetti G., Cimmaruta R., Lanza B., Bullini L. 1996. Molecular taxonomy of European plethodontid salamanders (genus *Hydromantes*). J. Herpetol. 30: 161—183.
- Nascetti G., Lanza B., Bullini L. 1995. Genetic data support the specific status of the Italian treefrog (Amphibia: Hylidae). Amphibia—Reptilia. 16:215—227.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. Amer. Natur. 196:283—292.
- Nei M. 1975. Molecular population genetics and evolution. Amsterdam: North-Holland Publ. 288 p.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70:3321—3323.
- Neva E., Filippucci M. G. 1988. Genetic differentiation between Israeli and Greek populations of the marsh frog, *Rana ridibunda*. Zool. Anz. 221: 418—424.
- Neva E., Yang S. Y. 1982. Genetic divergence and ecological relationships of marsh frog populations in Israel. Theor. Appl. Genet. 63:317—330.
- Nishioka M., Sumida M. 1992. Biochemical differentiation of pond frogs distributed in the Palearctic region. Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ. 11: 71—108.
- Nishioka M., Sumida M., Borkin L. J. 1990. Biochemical differentiation of the genus *Hyla* distributed in the Far East. Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ. 10:93—124.
- Nishioka M., Sumida M., Borkin L. J., Wu Z. 1992. Genetic differentiation of 30 populations of 12 brown frog species distributed in the Palearctic region elucidated by the electrophoretic method. Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ. 11: 109—160.
- Odendaal F. J., Bull C. M., Adams M. 1983. Genetic divergence between two morphologically similar *Ranidella* species (Anura: Leptodactylidae). Copeia. 1983:275—279.
- Rafihski J., Arntzen J. W. 1987. Biochemical systematics of the Old World newts, genus *Triturus*: allozyme data. Herpetologica. 43: 446—457.
- Ragghianti M., Wake D. B. 1986. Genie variation and its evolutionary implications in the Italian newt, *Triturus italicus*. Herpetologica. 42: 206—214.
- Ralin D. B., Romano M. A., Kilpatrick W. 1983. The tetraploid treefrog *Hyla versicolor*. evidence for a single origin from the diploid *H. chrysoscelis*. Herpetologica. 39: 212—225.
- Rawson P. D., Helbish T. J. 1998. Asymmetric introgression of mitochondrial DNA among European populations of blue mussels (*Mutilus* spp.). Evolution. 52: 100—108.
- Sage R. D., Prager E. M., Wake D. B. 1982. Cretaceous divergence time between pelobatid frogs (*Pelobates* and *Scaphiopus*): immunological studies of serum albumin. J. Zool. London. 198:481—494.
- Shaffer H. B. 1983. Biosystematics of *Ambystoma rosaceum* and *A. tigrinum* in northwestern Mexico. Copeia. 1983: 67—78.
- Shaw C. R., Prasad R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes — a compilation of recipes. Biochem. Genet. 4: 297—320.
- Sherwood S. W., Patton J. L. 1982. Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). Variation in cellular DNA content. Chromosoma. 85: 163—179.
- Sinsch U., Eblenkamp B. 1994. Allozyme variation among *Rana balcanica*, *R. levantina*, and *R. ridibunda* (Amphibia: Anura). Genetic differentiation corroborates the bioacoustically detected species status. Z. Zool. Syst. Evol.-forsch. 32: 35—43.
- Sinsch U., Juraska N. 1995. Reassessment of central Peruvian *Telmatobiinae* (genera *Batrachophrynus* and *Telmatobius*). Allozymes and phylogenetic relationships. Alytes. 13: 52—66.
- Sket B., Arntzen J. W. 1994. A black, non-troglophic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anguinus parkelj* n. ssp. (Urodela: Proteidae). Bijdrag. Dierkunde. 64: 33—53.
- Sneath P. H., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman. 573 p.

Thorpe J. P. 1982. The molecular clock hypothesis: biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Evol. Syst.* 13: 139—168.

Tilley S.G., Merrill R. B., Wu B., Highton R. 1978. Genetic differentiation in salamanders of the *Desmognathus ochrophaeus* complex (Plethodontidae). *Evolution*. 32:93—111.

Titus T. A., Larson A. 1996. Molecular phylogenetics of desmognathine salamanders (Caudata: Plethodontidae): a reevaluation of evolution in ecology, life history, and morphology. *Syst. Biol.* 45:451—472.

Tunner H. C., Heppich S. 1982. A genetic analysis of water frogs from Greece: evidence for the existence of a cryptic species. *Z. Zool. Syst. Evol.* 20: 209—223.

Veith M. 1994. Morphological, molecular and life history variation in *Salamandra salamandra* (L.). *Mertensiella*. 4: 355—397.

Veith M. 1996. Molecular markers and species delimitation: examples from the European batrachofauna. *Amphibia—Reptilia*. 17:303—314.

Veith M., Kosuch J., Ohler A., Dubois A. 2001. Systematics of *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorsh, 1829) (Amphibia, Anura, Ranidae) and related species. 2. Morphological and molecular variation in frogs from the Greater Sunda Islands (Sumatra, Java, Borneo) with the definition of two species. *Alytes*. 19:5—28.

Wake D. B. 1981. The application of allozyme evidence to problems in the evolution of morphology. In: *Evolution Today*.

Proc. 2 nd Intern. Congr. Syst. Evol. Biol. Pittsburgh: Carnegue-Mellon Univ. Press. 257—270.

Wake D. B., Lynch J. F. 1982. Evolutionary relationships among Central American salamanders of the *Bolitoglossa franklini* group, with a description of a new species from Guatemala. *Herpetologica*. 38: 257—272.

Wake D. B., Maxson L.R., Wurst G.Z. 1978. Genetic differentiation, albumin evolution, and their biogeographic implication in plethodontid salamanders of California and Southern Europe. *Evolution*. 32: 529—539.

Wake D. B., Roth G., Wake M. H. 1983. On the problem of stasis in organismal evolution. *J. Theor. Biol.* 101:211—224.

Wallace D. G., King M.-C., Wilson A. C. 1973. Albumin differences among ranid frogs: taxonomic and phylogenetic implications. *Syst. Zool.* 22: 1—13.

Wiens J. J. 2000. Reconstructing phylogenies from allozyme data: comparing method performance with congruence. *Biol. J. Linn. Soc.* 70: 613—632.

Wiens J. J., Servedio M. R. 1998. Phylogenetic analysis and intraspecific variation: performance of parsimony, likelihood, and distance methods. *Syst. Biol.* 47: 228—253.

Wiley E. O. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* 27: 17—26.

Поступила 7 V 2001

GENETIC VARIATION IN TWO CRYPTIC FORMS OF THE COMMON SPADEFOOT TOAD *PELOBATES FUSCUS* (PELOBATIDAE, ANURA, AMPHIBIA) DEFERRING IN GENOME SIZE

M. D. Khalturin,<sup>1\*</sup> S. N. Litvinchuk,<sup>1</sup> L. J. Borkin,<sup>2,3</sup> Yu. M. Rozanov,<sup>1</sup> K. D. Milto<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, <sup>2</sup> Zoological Institute RAS, St. Petersburg, and

<sup>3</sup> St. Petersburg Association of Scientists and Scholars;

\* e-mail: mkh@medport.ru

Genetic differences (presumed 23 loci) between two cryptic forms of *Pelobaies fuscus*, differing in genome size, were examined by means of polyacrylamide-gel electrophoresis. This method allowed to discriminate between these forms. Average genetic distance (D<sub>#</sub>) between both the forms was equal to 0.311, ranging from 0.055 to 0.563. As a rule, differences within these groups were smaller (0.021—0.388). The data show obvious genetic differentiation between these two cryptic forms of *P. fuscus*. Differences between these forms and *P. syriacus* were significantly higher (in average 0.943). Genetic distances in relation to speciation and species concepts are discussed.