

Лесостепь Восточной Европы: структура, динамика и охрана :
Л50 сб. ст. Междунар. науч. конф., посвящ. 140-летию со дня рождения
И. И. Спрыгина (г. Пенза, 10–13 июня 2013 г.). – Пенза : Изд-во ПГУ,
2013. – 410 с.

ISBN 978-5-94170-618-1

В сборнике представлены материалы устных докладов и стендовых сообщений Международной научной конференции, посвященной 140-летию со дня рождения И. И. Спрыгина.

Издание включает обширный краеведческий материал по Пензенскому краю: статьи, посвященные истокам рода Спрыгиных и описанию научной и общественной деятельности знаменитого ученого. Впервые публикуется прежде не изданная рукопись И. И. Спрыгина – отзыв на кандидатскую диссертацию впоследствии известного ботаника Л. М. Черепнина. Основное содержание сборника – описание результатов ботанических, зоологических и ландшафтных исследований лесостепи Восточной Европы учеными России и Украины.

Адресовано ботаникам, экологам, зоологам, географам, специалистам в области охраны живой природы, преподавателям вузов, аспирантам, студентам, учителям общеобразовательных учебных заведений.

УДК 58; 59; 911

Редакционная коллегия:

доктор биологических наук, профессор *Л. А. Новикова*;
кандидат биологических наук, доцент *Н. А. Леонова*

**Издание подготовлено при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проекту № 13-04-06025 Г**



Рисунок *Adonis vernalis* выполнен *Марией Леонардовной Урановой*,
используется как эмблема конференций,
посвященных памяти И. И. Спрыгина, с 1998 г.
Фотография *Adonis vernalis* – автор *Александр Николаевич Добролюбов*

Все материалы представлены в авторской редакции

УДК 597.851 (471.327)

НАХОДКА СЪЕДОБНОЙ ЛЯГУШКИ (*RANA ESCULENTA* L., 1758) В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ¹

О. А. Ермаков, М. М. Закс

Пензенский государственный университет, г. Пенза

Съедобная лягушка (*R. esculenta*) – вид гибридного происхождения, широко распространенный в Центральной, Восточной Европе, на западе и в центре Русской равнины [3, 8]. Восточнее, в Поволжье, снижается как количество находок вида, так и его численность [10]. В соседних с Пензенской областью регионах – Тамбовской, Ульяновской области и Республике Мордовия – известны достоверные находки вида [7, 9, 14]. На территории Пензенской обл. обитание съедобной лягушки предполагалось по данным морфометрического анализа [4], но не было подтверждено генетическими методами. Для точной идентификации этого гибридного вида в нашей стране обычно используется проточная ДНК-цитометрия, основанная на определении размера генома в клеточном ядре [1]. Кроме того, диагностика европейских зеленых лягушек (*R. esculenta* complex) возможна с использованием методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [13, 15]. В настоящей работе приводятся сведения о первой находке съедобной лягушки в административных границах Пензенской обл., подтвержденные молекулярно-генетическим анализом (ISSR-метод).

Материал и методы

Изучена выборка зеленых лягушек (n=15), отловленная 01.05.2008 г. в окрестностях нежилого пос. Александровка Земетчинского р-на Пензенской обл. (53°40'58,74"с.ш.; 42°12'02,24"в.д.) и предварительно определенная как «прудовая лягушка». Место отлова представляет собой небольшой пруд площадью 210 м², расположенный на опушке леса на расстоянии 200 м от заболоченной поймы малой реки Ленгас (приток 2-го порядка р. Выши, правого притока р. Цны). Для сравнения морфометрических параметров, в качестве «модельных», использовались выборки прудовой *R. lessonae* (г. Пенза, «Согласие», n=16) и озерной *R. ridibunda* (Камешкирский р-н, «Чирчим», n=22) лягушек, морфологические и биоакустические показатели которых были изучены нами ранее [5, 6]. Для молекулярно-генетической диагностики использовались по 4–5 особей из каждой выборки.

Морфологические измерения проводили по стандартной схеме, и на их основе были рассчитаны индексы пропорциональности [12]. Для статистической обработки применялись параметры средней арифметической (*m*), квадратичного отклонения (*SD*), *t*-критерий и дискриминантный анализ.

Молекулярно-генетическая диагностика проводилась ISSR-методом, основанным на амплификации последовательностей, ограниченных двумя микросателлитными повторами [11]. В результате образуются фрагменты, представленные на электрофореграмме дискретными полосами (ISSR-фингерпринтинг). Специфичность и полиморфизм ISSR-маркеров определяется по наличию/отсутствию полосы. Метод обладает хорошей воспроизводимостью, требует минимального оборудования и используется для многих экологических и систематических исследований [16]. В качестве проб для выделения ДНК использовали взятую прижизненно дистальную фалангу пальца передней конечности. ПЦР проводилась в стандартной реакционной смеси объемом 25 мкл в следующих условиях: 94°C – 45 сек, 58°C – 45 сек, 72°C – 1.5 мин, 30 циклов. Тестировались 7 различных праймеров, из которых был выбран один наиболее информативный (5'-(AG)₈G-3'). Амплификационные смеси анализировали при помощи электрофореза в 6 %-ном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

Результаты и обсуждение

Длина тела (*L*) экземпляров исследованных выборок варьировала в следующих пределах (*min*–*max*): *R.l.* «Земетчино» – 51.6–60.6–61.8 мм, *R.l.* «Согласие» – 55.0–62.6–72.0 мм, *R.r.* «Чирчим» – 60.8–70.6–80.2 мм. Из 13 индексов пропорциональности три индекса (*L*/*S*pos, *L*/*F*, *L*/*D*p) не показали достоверных отличий между сравниваемыми выборками и в дальнейшем анализе не учитывались. По пяти индексам (*L*/*C*i, *D*p/*C*i, *T*/*C*i, *L*tc/*C*i, *I*x) экземпляры из выборки «Земетчино» не имели достоверных отличий от прудовой лягушки, по двум (*L*/*L*tc, *L*/*C*s) – напротив, от озерной лягушки. Два индекса (*L*/*T*, *F*/*T*) ока-

Ермаков Олег Александрович, к.б.н., доцент, e-mail: oermakov@list.ru

Закс Михаил Михайлович, аспирант

¹ Работа поддержана РФФИ (грант № 12-04-97073_p-поволжье_a).

зались промежуточными, а один (L/Lc) достоверно отделял исследуемую выборку от двух «модельных» (табл. 1). По средним показателям пропорциональности характерными чертами экземпляров из выборки «Земетчино» являются относительно крупная голова (Lc, Ltc) и относительно длинный внутренний пятчатый бугор (Ci). Кроме того, размах изменчивости морфометрических признаков (SD) особей из этой популяции оказался гораздо выше, чем у особей из «Согласия» и «Чирчима» (табл. 1).

Таблица 1

Значения среднего арифметического (m) и стандартного отклонения (SD) индексов пропорциональности (жирным шрифтом выделены достоверные отличия «модельных» выборок от выборки *R. lessonae* «Земетчино»)

Вид, кол-во (n) выборка		L/Ltc	L/T	L/Ci	Dp/Ci	T/Ci	Ltc/Ci	L/Lc	L/Cs	F/T	Ix
<i>R. ridibunda</i> , n=22 «Чирчим»	m	2.90	1.96	17.79	2.88	9.09	6.15	2.95	3.42	0.94	46.04
	SD	0.19	0.06	1.38	0.25	0.71	0.53	0.09	0.14	0.05	7.27
<i>R. lessonae</i> , n=15 «Земетчино»	m	2.84	2.08	13.60	2.11	6.52	4.79	2.84	3.50	0.99	23.76
	SD	0.17	0.09	2.40	0.50	1.04	0.79	0.16	0.38	0.03	10.67
<i>R. lessonae</i> , n=16 «Согласие»	m	2.99	2.33	14.16	2.21	6.07	4.74	3.12	3.80	1.08	21.95
	SD	0.14	0.09	0.86	0.15	0.44	0.32	0.17	0.12	0.05	2.78

Мозаичность морфологических признаков выборки «Земетчино» подтверждается дискриминантным анализом (рис. 1, табл. 2), где ось первой функции объясняет 86 % дисперсии. Наибольший вклад в дискриминацию по оси первой функции вносят факторы пропорциональности задней конечности и пятчатого бугра (L/T, T/Ci, F/T), по второй – относительные размеры головы (L/Lc).

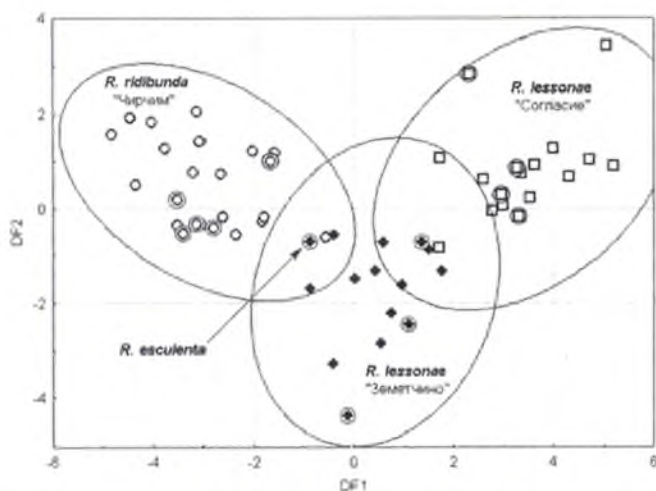


Рис. 1. Результаты дискриминантного анализа по индексам пропорциональности трех выборок зеленых лягушек (круглой обводкой выделены экземпляры, для которых проведен молекулярно-генетический анализ)

Таблица 2

Результаты дискриминантного анализа по индексам пропорциональности трех выборок зеленых лягушек

Признак	Факторные нагрузки	
	DF1	DF2
L/T	0.70	0.36
T/Ci	-0.59	0.53
F/T	0.53	0.27
L/Ci	-0.33	0.57
L/Ltc	0.07	0.23
L/Lc	0.18	0.59
Кум. доля (%)	86	14
λ Уилкса	0.05	0.44

Эллипсы рассеивания с вероятностью 95 % не перекрываются у «модельных» выборок, тогда как эллипс рассеивания выборки «Земетчино» по оси первой функции занимает промежуточное положение, образуя зоны перекрытия.

Таким образом, сложная картина изменчивости морфологических признаков выборки «Земетчино» позволяет предположить наличие среди исследованных экземпляров съедобной лягушки. Однако неоднократно отмечено, что к определению видов комплекса *Rana esculenta* только с помощью морфометрии надо относиться с большой осторожностью, см. например [2]. Поэтому нами был проведен молекулярно-генетический анализ озерной ($n=5$, выборка «Чирчим») и прудовой ($n=4$, выборка «Согласие»; $n=4$, выборка «Земетчино») лягушек, взятых случайным образом. Паттерны всех экземпляров из «модельных» выборок оказались видоспецифичными, однако три из четырех особей выборки «Земетчино» имели паттерны, характерные для прудовой лягушки, а одна имела гибридное происхождение, что позволяет диагностировать ее как съедобную лягушку. ISSR-фингерпринт, полученный при помощи праймера $(AG)_8G$, для трех экземпляров каждого вида *Rana esculenta* complex приведен на рис. 2.

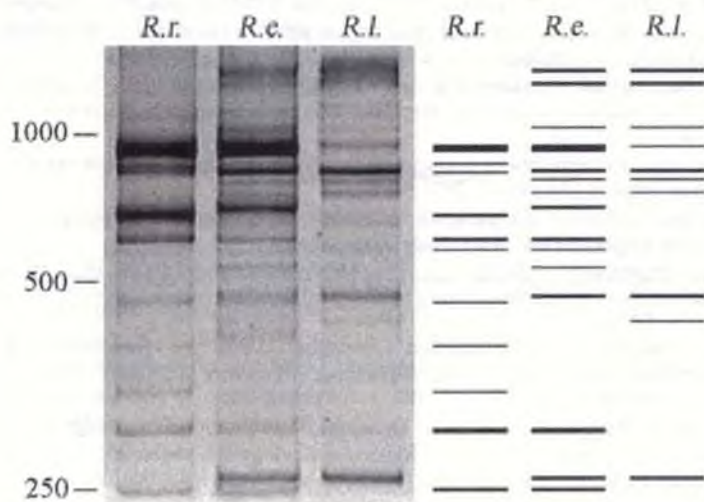


Рис. 2. Электрофореграмма и схема паттернов ПЦР-фрагментов ядерной ДНК, полученных при ISSR-анализе с праймером $(AG)_8G$ (*R.r.* – озерная, *R.e.* – съедобная, *R.l.* – прудовая лягушка). Размеры фрагментов в парах нуклеотидов указаны слева

На электрофореграмме и схеме видно, что паттерны ПЦР-фрагментов в данной системе видоспецифичны. Это говорит о том, что, несмотря на ряд недостатков, к которым следует отнести достаточно большое количество ПЦР-фрагментов, анонимность изучаемых структур и возможное несоответствие между наблюдаемым и реальным числом отличий (например, из-за присутствия гетеродуплексных фрагментов), ISSR метод может давать весьма ценную информацию в исследованиях, подобных нашему. На рисунке отчетливо видно наличие в паттерне *R. esculenta* ПЦР-фрагментов, характерных как для озерной, так и для прудовой лягушек. Гибридный экземпляр наследует 5 из 11 фрагментов, специфичных для *R. ridibunda*, и 8 из 10 фрагментов, специфичных для *R. lessonae*. Причем эти данные коррелируют с результатами морфологического анализа, где у особей из выборки «Земетчино» также отмечено некоторое преобладание признаков прудовой лягушки. Звуковые сигналы самцов на слух соответствовали *R. lessonae*. Экземпляр *R. esculenta* (♂, цветовая морфа «str/mac») имел следующие размерные показатели (мм): L–68.1, F–31.4, T–32.9, Dp–10.0, Ci–4.2, Lc–23.2, Ltc–23.4, Spoc–9.4, Lo–7.5, Cs–19.8.

Таким образом, результаты комплексного анализа позволили доказать обитание на территории Пензенской области съедобной лягушки, и отнести изученную популяцию к LE-типу (смешанные системы из *R. lessonae* и *R. esculenta*). Учитывая относительную редкость прудовой лягушки в нашем регионе, ее биотопическую приуроченность и находки в соседних областях, дальнейшее обнаружение вида возможно в северо-западных и восточных облесенных районах области.

Список литературы

1. Боркин Л.Я., Виноградов А.Е., Розанов Ю.М., Цауне И.А. Полуклональное наследование в гибридогенном комплексе *Rana esculenta*: доказательство методом проточной ДНК-цитометрии // Докл. АН СССР. М., 1987. Т. 295, №5. С. 1261–1264.
2. Борисовский А.Г., Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М. Морфометрическая характеристика зеленых лягушек (комплексе *Rana esculenta*) Удмуртии // Вестн. Удмурт. ун-та. 2000. № 5. С. 70–75.

3. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Лада Г.А., Ручин А.Б., Файзулин А.И., Замалетдинов Р.И. Гибридогенный комплекс *Rana esculenta*: существует ли «волжский парадокс»? // III конф. герпетологов Поволжья. Мат. регион. конф. Тольятти, 2003. С. 7–12.
4. Ермаков О.А., Ильина О.В. К вопросу о видовом статусе зеленых лягушек Пензенской области // II конф. герпетологов Поволжья. Тез. докл. Тольятти: ИЭВБ РАН, 1999. С. 18–19.
5. Закс М.М. К вопросу о морфологических различиях популяций озерной лягушки (*Pelophylax (Rana) ridibundus*) Пензенской области // Известия ПТТУ им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 209–212.
6. Закс М.М., Рыжов М.К., Ермаков О.А. Съедобная лягушка (*Rana esculenta*, L., 1758) в Чувашии: биоакустические данные // Вопросы герпетологии. Матер. IV съезда герпетологического о-ва им. А.М. Никольского. СПб: Русская коллекция, 2011. С. 93–96.
7. Кривошеев В.А. О находке нового вида съедобной лягушки *Rana kl. esculenta* (L., 1758) на территории Ульяновской области // Природа Симбирского Поволжья: Сб. науч. тр. Ульяновск: Изд-во УлГТУ, 2001. Вып. 2. С. 154–156.
8. Лада Г.А., Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М. Типы популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) на территории Русской равнины // Вопр. герпетол.: Мат. IV съезда Герпетологического о-ва им. А. М. Никольского. С-Пб.: ЗИН РАН, 2011. С. 142–148.
9. Ручин А.Б., Боркин Л.Я., Лада Г.А., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Рыжов М.К. Морфологическая изменчивость, размер генома и популяционные системы зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) Мордовии // Бюллетень МОИП, отд. биолог. 2005. Т. 110, Вып. 2. С. 3–10.
10. Ручин А.Б., Лада Г.А., Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Рыжов М.К., Замалетдинов Р.И. О биотопическом распределении трех видов зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) в бассейне р. Волги // Поволжский экологич. журн. 2009. №2. С. 137–147.
11. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения // Успехи соврем. биологии. 2004. Т.124, №3. С. 260–271.
12. Тарашук С.В. Схема морфометрической обработки представителей семейства настоящих лягушек // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. Киев: Наук. думка, 1989. С. 73–74.
13. Hauswaldt J.S., Hber M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziewulska-Szwałkowska D., Czernicka E., Vences M. A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*) // *Mol. Ecol. Resour.* 2012. V. 12(5). P. 797–805.
14. Lada G.A., Borkin L.J., Vinogradov A.E. Distribution, population systems and reproductive behaviour of green frogs (hybridogenetic *Rana esculenta* complex) in the Central Chernozem Territory of Russia // *Russ. J. Herp.* 1995. V. 2, №1. P. 46–57.
15. Patrelle C., Ohst T., Picard D., Pagano A., Sourice S., Dallay M. G., Plötner J. A new PCR-RELP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs // *Molecular Ecology Resources.* 2011. V.11. P. 200–205.
16. Wolfe A.D. ISSR techniques for evolutionary biology // *Methods in enzymology.* 2005. V. 395. P. 134–144.