

Modern data on distribution, biology (food, seasonal and daily activity, number) and morphology of the Caspian whip snake in the territory of Volgograd Province are submitted.

Key words: Caspian whip snake; *Hierophis caspius*; distribution; morphology; Volgograd Province.

УДК 597.851 (471.327)

ДИАГНОСТИКА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ «ЗАПАДНОЙ» И «ВОСТОЧНОЙ» ФОРМ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* S. L. В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ (ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ГЕНА COI мтДНК)

© О.А. Ермаков, М.М. Закс, С.В. Титов

Ключевые слова: озерная лягушка; *Pelophylax ridibundus*; цитохром оксидаза; распространение; Пензенская область.

Определена первичная структура гена цитохром оксидазы мтДНК озерных лягушек из Пензенской области. При помощи рестрикционного анализа предложен скрининговый метод диагностики «восточной» и «западной» форм этого видового комплекса. Выявлено преобладание «восточной» формы в изученном регионе.

ВВЕДЕНИЕ

Еще недавно было общепринято, что озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) обитает от северо-западной Африки до восточного Казахстана. Однако исследования последнего десятилетия показали, что под этим названием скрывается целый «букет» морфологически сходных видов [2, 9], в котором различают до 9–10 форм видового ранга, ранее относимых к озерной лягушке [1]. На территории нашей страны этот комплекс изучен недостаточно, но по ряду различий физиологических и биохимических параметров ранее были выделены две формы – «западная» и «восточная» [2]. Молекулярно-генетические данные об обитании этих двух форм озерной лягушки на территории России ограничиваются работой [5], где показано, что «восточная» форма (*Pelophylax* cf. *bedriagae*), за исключением случаев непреднамеренной интродукции, распространена до линии Волгоград – Уральск – Орск, а северо-западнее обитает «западная» форма (*P. ridibundus*).

Ранее в Пензенской области нами были обнаружены межпопуляционные отличия *P. ridibundus* по морфологическим и биоакустическим признакам [3–4]. Поискам молекулярно-генетических различий популяций озерной лягушки по данным ДНК-штрихкодирования (DNA barcoding) [6], основанном на анализе последовательности первой субъединицы гена цитохром оксидазы (COI) митохондриальной ДНК (мтДНК), и распространению на территории Пензенской области гаплотипов мтДНК «западной» и «восточной» форм посвящено данное исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всего проанализировано 143 особи озерной лягушки из 21 географического пункта. Ниже перечислены номера, рабочие названия выборок (по ближайшему крупному населенному пункту или урочищу), географические координаты (широта/долгота) и количество

исследованных особей (*n*), соответствующие таковым на рис. 2, 4 и в табл. 1: 1. «Чирчим» 52°45′/46°23′ (*n* = 21); 2. «Круглый» 53°03′/45°11′ (*n* = 17); 3. «Сосновка» 52°59′/46°49′ (*n* = 15); 4. «Борок» 52°56′/46°18′ (*n* = 9); 5. «Ахуны» 53°10′/45°05′ (*n* = 10); 6. «Сердобск» 52°23′/44°20′ (*n* = 10); 7. «Кордон» 52°59′/45°22′ (*n* = 9); 8. «Автодром» 53°12′/44°56′ (*n* = 5); 9. «Барковка» 53°07′/45°05′ (*n* = 5); 10. «Мастиновка» 53°17′/44°51′ (*n* = 5); 11. «Зап. Поляна» 53°10′/44°58′ (*n* = 4); 12. «Городище» 53°14′/45°43′ (*n* = 3); 13. «Пазелки» 53°21′/45°23′ (*n* = 2); 14. «Бакшеевка» 53°11′/45°20′ (*n* = 2); 15. «Грабово» 53°23′/45°04′ (*n* = 2); 16. «Нижний Ломов» 53°32′/43°41′ (*n* = 2); 17. «Наровчат» 53°53′/43°42′ (*n* = 5); 18. «Верхозим» 52°53′/46°20′ (*n* = 5); 19. «Кузнецк» 53°07′/46°36′ (*n* = 2); 20. «Шкудим» 53°23′/46°27′ (*n* = 5); 21. «Бикмурзино» 52°47′/46°48′ (*n* = 6).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК использовалась часть пальца передней конечности амфибий, взятая прижизненно и зафиксированная в 96 %-ном этаноле. ДНК выделяли по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (SDS) и протеиназой К при 50 °С с последующими фенольно-хлороформной очисткой и осаждением охлажденным абсолютным этиловым спиртом в сильно солевой среде [10].

PCR-реакцию проводили в стандартной реакционной смеси (50 мМ трис-НСI (рН 8.9), 20 мМ сульфата аммония, 20 мМ ЭДТА, 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мМ каждого), 2 мМ хлористого магния, 15 пмолей праймера и 2 ед. акт. Таq-полимеразы) в течение 30 циклов в режиме: 94 °С – 1 мин., 60 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин.

Использовали универсальные праймеры для гена COI [8]: VUTF 5′-tgt-aaa-acg-acg-gcc-agt-tct-caa-cca-auc-aya-arg-aya-tyg-g; VUTR 5′-cag-gaa-aca-gct-atg-act-ara-ctt-ctg-grt-gkc-cra-ara-auc-a.

Секвенирование фрагмента гена COI проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Для реконструкции филогенетических

```

PR 'W' AACCCCTTAC TTAATTTTGG GTGCGTGAGC CGGATAGTCG GTACAGCTCT TAGCCTGCTT 60
PR 'E' .....C.....A.....G.....C.....
PR 'W' ATTCGAGCAG AACTTAGCCA ACCCGGGACT CTTCTCGGTG ACGACCAAAT TTATAATGTA 120
PR 'E' .....G.....T..A.....C.....T.....
PR 'W' ATTGTTACTG STCATGCCTT CGTTATAATT TTCTTTATAG TTATGCCTAT TCTAATTGGA 180
PR 'E' .....C.....G.....C.....
PR 'W' GGCTTCGAA ATTGACTTGT ACCCCTCATG ATTGGGGCCC CTGATATYGC CTTCCCCCGG 240
PR 'E' .....T.....C..G..A.....C.....T.....A
PR 'W' ATAAACAACA TGAGTTTTTG ACTCTTACCC CCTCCCTTCT TTCTCCTTCT AGCATCCCTCC 300
PR 'E' .....C.....T.....
PR 'W' ACGGTTGAAG CCGGGGCGAG CACAGGCTGA ACTGTTTATC CTCCCTGGC GGGAAACCTT 360
PR 'E' .....C.....
PR 'W' GCCCATGCAG GACCCCTGTG CGACCTAGCC ATCTTTTCTC TTCATTGGC TGGGGTTTCA 420
PR 'E' ..T.....A.....G.....
PR 'W' TCAATTCTGG GGGCCATCAA CTTTATTACA ACAATTATTA ATATGAAGCC CACATCAATC 480
PR 'E' .....T.....C.....C.....
PR 'W' ACGCAATACC AAACACCCTT TTTTGTTTGA TCTGTACTAA TCACCGCTGT ACTACTTCTT 540
PR 'E' .....T.....C.....
PR 'W' CTGTCCCTCC CAGTTCTAGC AGCAGGCATC ACAATACTGT TGACCGATCG AAACCTAAAC 600
PR 'E' ..T.....T.....
PR 'W' ACAACATTTT TTGATCTGCG AGGTGGAGGG GATCCTGTTC TTTACCAGCA CCTGTTT 657
PR 'E' .....C.....C.....C..C.....A.....

```

Рис. 1. Первичная структура фрагмента гена COI мтДНК двух форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* (PR): 'W' – западная форма; 'E' – восточная. Приведены позиции замен, идентичные нуклеотиды отмечены точками, сайты рестрикции Rsa I (GTAC) – обводкой

отношений использовали метод максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 5.05 [11]. В качестве внешней группы были взяты последовательности COI чернопятнистой (*Pelophylax nigromaculatus*) и восточнокитайской (*P. plancyi*) лягушек.

PCR-фрагменты гидролизуют рестрикционной эндонуклеазой RsaI 2–4 ч при 37 °C, добавляя 2–4 ед. акт. фермента непосредственно к аликватам амплификационных смесей (5 мкл). После рестрикции амплификационные смеси анализировали при помощи электрофореза в 6 %-ном ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы определили первичную структуру 5'-домена COI длиной 657 пар нуклеотидов (п.н.) для 26 экз. озерной лягушки и 1 экз. прудовой лягушки (*Pelophylax lessonae*). Полученные данные и анализ последовательностей COI из базы данных NCBI позволили нам выявить две различные митохондриальные группы и соответственно разделить по этому признаку озерных лягушек Пензенской области на две формы (рис. 1, 2).

Различия между двумя формами озерных лягушек составили 5,2 % нуклеотидных замен, что практически соответствует видовому уровню. Ранее пороговый видовой уровень для амфибий по гену COI был предложен на уровне 10 % нуклеотидных замен [12], однако позднее было отмечено, что расхождение на более чем 5 % замен свидетельствует о достаточной внутривидовой изменчивости [13] и возможном видовом статусе сравниваемых форм. Отметим, что по нашим данным различия между прудовой лягушкой и обеими формами озерной лягушки в среднем составили 14 % нуклеотидных замен.

На приведенной кладограмме (рис. 2) «западная» и «восточная» формы образуют два четко обособленных и статистически поддержанных кластера. Из них к «западной» форме отнесены выборки лягушек Пензенской

обл., гаплотипы которых минимально отличались от гаплотипов польских лягушек из базы данных NCBI, образуя с ними единую кладу с 95 % поддержкой. Гаплотипы остальных выборок области отнесены нами к «восточной» форме, которая оказалась сестринской к экземплярам озерных лягушек неясной таксономической формы из Китая.

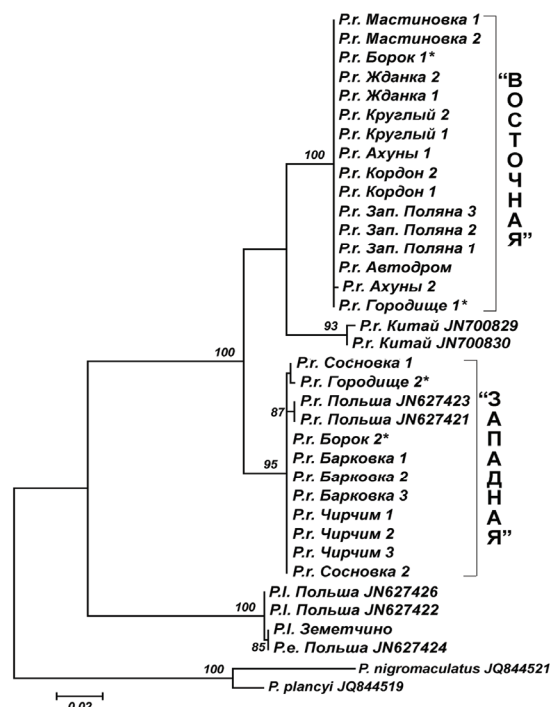


Рис. 2. ML – дерево озерных (*P.r.*) и прудовых (*P.l.*) лягушек по данным секвенирования гена COI мтДНК. Обозначения 1, 2, 3 относятся к разным особям из одной выборки. Звездочкой обозначены места совместного обитания (синтопии) «западной» и «восточной» митохондриальных форм. JN..., JQ... – последовательности из базы данных NCBI. Индексы бутстреп-поддержки <70 % не показаны

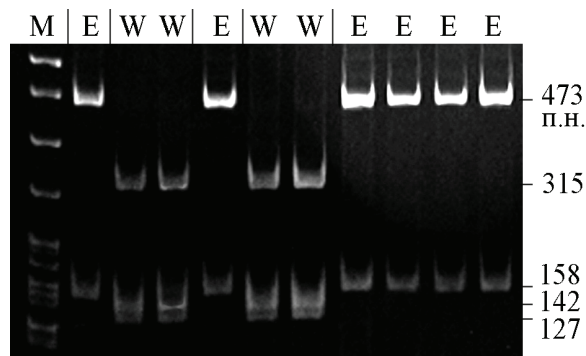


Рис. 3. Пример рестрикционного (RsaI) скрининга фрагмента гена COI мтДНК озерных лягушек (выборка «Чирчим»). Размеры фрагментов в парах нуклеотидов (п.н.) указаны справа. Сокращенные обозначения митохондриальных форм – сверху (W – «западная», E – «восточная»). Маркер молекулярных масс (M) – HpaII-гидролизат pBR

Анализ расшифрованной структуры COI показал наличие в ней четырех сайтов узнавания рестрикционной эндонуклеазы RsaI (GTAC), два из которых оказались общими для обеих форм озерной лягушки и два – видоспецифичными для «западной» формы (рис. 1). Мы воспользовались этим обстоятельством и на втором этапе исследования применили рестрикционный анализ для скрининга всей имеющейся в нашем распоряжении выборки. При обработке рестриктазой RsaI PCR-фрагмент у «западной» формы расщепляется на три фрагмента – 315, 145 и 127 п.н., а у «восточной» на два – 473 и 158 п.н., что позволило провести диагностику исследуемых экземпляров по фореграммам рестрикции (рис. 3).

Результаты анализа, приведенные в табл. 1 и на рис. 4, выявили значительное преобладание «восточной» митохондриальной формы озерной лягушки на исследованной территории. Это касается как общего числа исследованных экземпляров, где более 70 % особей имеет «восточный» гаплотип, так и соотношения поселений по обитанию в них той или иной формы. Из 21 изученного поселения нами обнаружено лишь одно (4,8 %) (точка 21, «Бикмурзино»), в котором все 6 отловленных лягушек несли «западный» гаплотип. В 12 поселениях (57,1 %) отмечены лягушки только с «восточным» гаплотипом, и оставшиеся 8 поселений (38,1 %) оказались синтопическими.

Предварительно можно отметить, что «западная» форма приурочена к естественным лесным ландшафтам, т. к. большинство точек находок этой формы привязано к руслам рек (верховья Суры и Кадады). «Восточная» форма, по-видимому, предпочитает открытые и антропогенные ландшафты, в т. ч. урбанизированные.

Ранее зона совместного обитания двух рассматриваемых форм озерной лягушки была известна в юго-восточной Европе, а также Прикаспии [7]. В результате наших исследований мтДНК выявлено, что в Поволжье «восточная» форма распространена практически до 54 параллели и также образует совместные поселения с «западной» формой, что предполагает в дальнейшем обнаружение в этом регионе гибридных особей по данным анализа ядерной ДНК.

Таблица 1

Генетические характеристики 143 экземпляров озерной лягушки из 21 исследованного поселения (W – аллели «западной» формы, E – «восточной»)

Выборка, n – число экз.	Ген COI мтДНК	
	W	E
1. Чирчим (n = 21)	9	12
2. Круглый (n = 17)	2	15
3. Сосновка (n = 15)	9	6
4. Борок (n = 9)	6	3
5. Ахуны (n = 10)	–	10
6. Сердобск (n = 10)	–	10
7. Кордон (n = 9)	1	8
8. Автодром (n = 5)	–	5
9. Барковка (n = 5)	4	1
10. Мастиновка (n = 4)	–	4
11. Западная Поляна (n = 4)	–	4
12. Городище (n = 3)	1	2
13. Пазелки (n = 2)	–	2
14. Бакшеевка (n = 2)	–	2
15. Грабово (n = 2)	–	2
16. Нижний Ломов (n = 2)	–	2
17. Наровчат (n = 5)	–	5
18. Верхозим (n = 5)	4	1
19. Кузнецк (n = 2)	–	2
20. Шкудим (n = 5)	–	5
21. Бикмурзино (n = 6)	6	–
Итого: абс. (%)	42 (29,4)	101 (70,6)

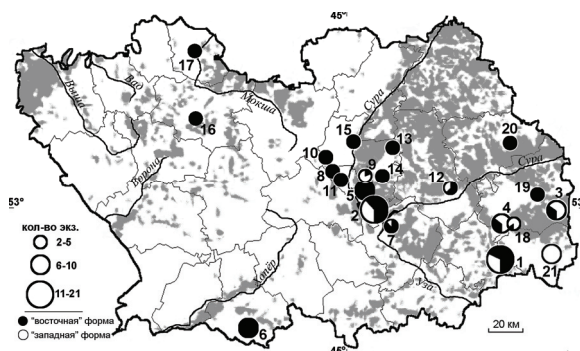


Рис. 4. Распространение «западных» и «восточных» гаплотипов мтДНК у озерных лягушек района исследования (номера точек на карте соответствуют таковым в разделе «Материал и методы» и табл. 1)

ЛИТЕРАТУРА

1. Боркин Л.Я. Класс Амфибии, или Земноводные – Amphibia // Ананьева Н.Б., Боркин Л.Я., Даревский И.С., Орлов И.Л. Земноводные и пресмыкающиеся. М., 1998. С. 19-174.
2. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринов Д.В. О критических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. № 8. С. 936-960.
3. Зас М.М. К вопросу о морфологических различиях популяций озерной лягушки (*Pelophylax (Rana) ridibundus*) Пензенской области // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 209-212.
4. Зас М.М., Ермаков О.А. Межпопуляционная изменчивость звукового сигнала озерной лягушки *Pelophylax (Rana) ridibundus* в Среднем Поволжье // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 213-215.

5. Akin C., Bilgin C.C., Beerli P., Westaway R. 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.
6. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Roy. Soc. B: Biol. Sci. 2003. V. 270. P. 313-321.
7. Hotz H., Beerli P., Uzzell T., Guex G.D. et al. Balancing a cline by influx of migrants: a genetic transition in water frogs of eastern Greece // J. Hered. 2013. V. 104 (1). P. 57-71.
8. Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // Mol. Ecol. Not. 2007. V. 7 (4). P. 544-548.
9. Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C. et al. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs // Evolution in Action / ed. by M. Glaubrecht. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 373-403.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory Manual. V. 3. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
11. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28 (10). P. 2731-2739.
12. Vences M., Thomas M., Bonett R.M., Vieites D.R. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges // Phil. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sci. 2005. V. 360. P. 1859-1868.
13. Xia Y., Gu H-F., Peng R., Chen Q. et al. COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae) // Mol. Ecol. Res. 2012. V. 12. P. 48-56.

БЛАГОДАРНОСТИ: Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 12-04-97073-р_поволжье_а) и в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (№ 14.В37.21.0189).

Поступила в редакцию 15 мая 2013 г.

Ermakov O.A., Zaks M.M., Titov S.V. DIAGNOSTICS AND DISTRIBUTION OF “WESTERN” AND “EASTERN” FORMS OF MARSH FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* S. L. IN THE PENZA PROVINCE (ON DATA OF ANALYSIS OF MTDNA CYTOCHROME OXIDASE GENE)

The primary structure of the cytochrome oxidase gene of mtDNA of marsh frogs in Penza Province is determined. Using restriction analysis, the screening method for diagnosis of “eastern” and “western” forms of this species complex is proposed. The predominance of the “eastern” form in the studied region is revealed.

Key words: marsh frog; *Pelophylax ridibundus*; cytochrome oxidase; distribution; Penza Province.

УДК 57.084.1

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕННОСТИ НА НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПОВЕДЕНИЯ ОБЫКНОВЕННОГО УЖА (*NATRIX NATRIX*) В ЛАБОРАТОРНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

© Р.В. Желанкин

Ключевые слова: змеи; освещенность; оптомоторный барабан; фототаксис; термотаксис.

В наших экспериментах было доказано, что первичной реакцией ужей (*Natrix natrix*) на любой источник света является стремление к нему – фототаксис. Змеи всегда выбирали место с наибольшей освещенностью. Стремление к теплу – термотаксис – был вторичным по отношению к фототаксису. Было установлено, что при скорости вращения оптомоторного барабана 2 об./мин. реакция следования за полосами максимальна и превышает число поворотов при различной освещенности. Понижение температуры ниже 0 °С, как и повышение освещенности выше 500 Лк, приводят к учащению и ускорению движений змей.

ВВЕДЕНИЕ

Информация, получаемая посредством органа зрения – глаза, зависит от параметров попадающего на сетчатку света. Таковыми являются различия в интенсивности и длине световых волн. Помимо видимого света (380–760 нм), некоторые рептилии способны воспринимать ультрафиолетовое и инфракрасное излучение [7].

Известно, что активность рептилий регулируется как температурным, так и световым режимами, что было показано на среднеазиатских эфах [5].

У других рептилий также ключевую роль в физиологических процессах, таких, как накопление жира, играет температура тела. Соответственно, многие рептилии в солнечную погоду греются, поглощая инфракрасные лучи, посредством баскинга (движений, направленных на максимальное получение тепла) и изменения окраски, но при этом индикатором для выхода

их из убежища служит повышение освещенности [3]. С изменением климатических условий, в частности освещенности, закономерно изменяется и допустимое время активности рептилий данного вида, и к этому режиму подстраивается эндогенная ритмика [4, 7].

Исследования Н.А. Четанова [6] показали, что первоначальным стимулом для терморегуляционного поведения у прытких ящериц (*Lacerta agilis*) и живородящих ящериц (*Zootoca vivipara*) является освещенность. В опыте с двумя камерами, соединенными коридором, большинство ящериц (8 из 12 особей) направлялись вначале в освещенную камеру, и только через 2–8 мин. переходили по коридору в темную утепленную камеру.

Оптомоторная реакция присутствует у многих животных, в т. ч. у рептилий. Реакция возникает, т. к. при вращении всего видимого мира неподвижно сидящее животное пытается стабилизировать общую картину, потому что существенным функциональным назначе-