

УДК 597.851 (471.43)(470.44)

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ «ЗАПАДНОЙ» И «ВОСТОЧНОЙ» ФОРМ
ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* S. L.
НА ТЕРРИТОРИИ САМАРСКОЙ И САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТЕЙ
(по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК)**

© 2014 О.А. Ермаков¹, А.И. Файзулин², М.М. Закс¹, Э.И. Кайбелева³, Ф.Ф. Зарипова²

¹ Пензенский государственный университет, г. Пенза

² Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

³ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов

Поступила 01.05.2014

Проведен молекулярно-генетический анализ 71 экз. озерной лягушки из 21 локалитета Самарской, Саратовской областей и прилегающих районов. Установлено, что в районе исследования обитают две генетически дифференцированные формы озерной лягушки – «восточная» и «западная». Выявлено несовпадение распределения частот аллелей митохондриальной и ядерной ДНК – большинство озерных лягушек имели яДНК «западной» формы, а мтДНК «восточной» формы. Изучены особенности географического распространения криптических форм и их биотопической приуроченности.

Ключевые слова: озерная лягушка, *Pelophylax ridibundus*, молекулярно-генетические маркеры, распространение, Самарская область, Саратовская область

В настоящее время среди бесхвостых амфибий выявлен ряд криптических форм различного таксономического статуса [1]. На территории Русской равнины известны «западные» и «восточные» формы у чесночниц, «номинативная» и «переднеазитская» у зеленых жаб, которые рассматриваются в качестве подвидов или видов [4, 5, 8, 9, 12].

У озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* также имеются формы с неясным таксономическим статусом и требующие дальнейшего исследования [1]. На территории Поволжья отмечены две генетически дифференцированные формы – «западная» *P. ridibundus* и «восточная» *P. cf. bedriagae*. По данным анализа митохондриальной ДНК крайними северными географическими пунктами распространения «восточной» формы ранее указывались Волгоград – Уральск – Орск [7]. Позднее нами было показано, что в Поволжье (Пензенская обл.) «восточная» форма распространена до 54 параллели, а в зоне симпатрии двух форм обитают лягушки с «западными», «восточными» гаплотипами, а также экземпляры гибридного происхождения [2, 3]. Отметим, что «западная» и «восточная» формы пространственно не изолированы, достоверных морфологическим отличий между ними нами не обнаружено [3], что позволяет их рассматривать как криптические.

Данное исследование посвящено изучению распространения двух криптических форм озер-

ной лягушки на территории Самарской и Саратовской областей с использованием молекулярно-генетических маркеров митохондриальной и ядерной ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Всего проанализирован 71 экз. озерной лягушки: 65 экз. из 19 географических пунктов Самарской и Саратовской областей и 6 экз. из 2-х локалитетов пограничных с Оренбургской и Волгоградскими областями (табл. 1).

Молекулярно-генетический анализ выполнен в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета. В качестве образцов тканей для выделения ДНК использовалась часть пальца передней конечности амфибий, взятая прижизненно. ДНК выделяли по стандартной методике [11].

Использовались 2 молекулярно-генетических маркера: для митохондриальной ДНК (мтДНК), наследуемой по материнской линии – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы *COI*, для ядерной ДНК (ядДНК), имеющей «менделеевский» тип наследования – интрон 1 гена сывороточного альбумина *SAI* [10].

Генетическое типирование, позволяющее определять принадлежность гаплотипов мт- и яДНК к «восточной» или «западной» форме проводилось по методике опубликованной нами ранее [3]. При расчете частот встречаемости гаплотипов учитывалось, что мтДНК является гаплоидной и формально может рассматриваться как один аллель, поэтому процентное соотношение аллелей и исследованных экземпляров равно. яДНК диплоидна, содержит два аллеля одного гена, соответственно доли аллелей и экземпляров той или иной формы различны в зависимости от соотношения гомо- и гетерозиготных особей. Различия частот

Ермаков Олег Александрович, кандидат биологических наук, доцент, oaermakov@list.ru; Файзулин Александр Ильдусович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, amvolga@inbox.ru; Закс Михаил Михайлович, кандидат биологических наук, zaks.pnz@gmail.com; Кайбелева Эльмира Исмаиловна, инженер, biofac@sgu.ru; Зарипова Фаля Футаевна, к.б.н., асс., e-mail: faliabio@yandex.ru

аллелей оценивались с помощью двустороннего критерия Фишера (F, two-tailed) в программе STATISTICA (www.statsoft.com).

Классификацию биотопов, где были отловлены озерные лягушки, проводили по методике предложенной в работе [6].

Таблица 1. Характеристика исследованного материала. Номера, указанные перед адресом, соответствуют номерам точек на картах (рис.)

№	Локалитет	Год	n	Координаты	
				N	E
Самарская область					
1	Елховский р-н, с. Красные дома	2012	5	53,830	50,357
2	г. Самара, пруд на ул. Бронной	2012	5	53,269	50,230
3	г. Самара, пруд на ул. 8 просека	2013	5	53,261	50,195
4	г. Самара, пруд «Нижний», Ботанического сад	2013	5	53,216	50,178
5	г. Самара, озера у платформы «Соцгород», ул. Заводская	2012	5	53,124	50,072
6	Ставропольский р-н, пос. Мордово, протока «Кольцовская воложка» Саратовское вдхр.	2011	5	53,172	49,440
7	Сызранский р-н, пруд у с. Смолькино, верховья р. Уса	2011	5	53,453	48,126
8	Большечерниговский р-н, пруд у пос. Большая Черниговка	2007	5	52,100	50,878
Оренбургская область					
9	Бузулукский р-н, с. Колтубан	2012	5	52,917	51,932
Саратовская область					
10	Пугачевский р-н, окр. с. Каменка (пойма р. Бол. Иргиз)	2006	2	51,937	48,692
11	Пугачевский р-н, окр. г. Пугачев (пойма р. Бол. Иргиз)	2009	2	52,000	48,848
12	Ершовский р-н, окр. с. Чапаевка (р. Б. Кушум)	2011	2	51,634	48,042
13	Хвалынский р-н, г. Хвалынский	2013	5	52,493	48,075
14	Ртищевский р-н, с. Урусово, р. Песчанка (приток р. Хопер)	2013	1	52,388	43,779
15	окр. г. Аткарск, (пойма р. Медведица)	2012	5	51,831	45,994
16	Аткарский р-н, окр. с. Приречное (пойма р. Медведица)	2006	1	51,745	44,929
17	Аткарский р-н, г. Аткарск (р. Аткара)	2009	1	51,873	44,989
18	Воскресенский р-н, о-в Чардым, Волгоградское вдхр.	2012	1	51,736	46,333
19	Лысогорский р-н, окр. с. Урицкое	2011	2	51,428	44,935
20	Балашовский р-н, с. Алмазово, (р. Хопер)	2013	3	51,552	42,917
Волгоградская область					
21	Камышинский р-н, окр. пос. Щербаковка	2001	1	50,512	45,764

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетические характеристики исследованных экземпляров выборки представлены в таблице 2. В первую очередь отметим несоответствие частот распределения двух генетических маркеров. Если результаты анализа маркера мтДНК (COI) показали почти двукратное преобладание в общей вы-

борке гаплотипов «восточной» формы: B – 63%, R – 37%, то исследования маркера яДНК (SAI) напротив – трехкратное преобладание аллелей «западной» формы: R – 89%, B – 11%. Различия частот встречаемости аллелей мт- и яДНК достоверны ($p = 0,0001$).

Таблица 2. Генетические характеристики озерных лягушек ($n=71$) района исследований, R – аллели *P. ridibundus*, B – аллели *P. cf. bedriagae*, H – гетерозигота; экз. (%)

мтДНК – ген COI							
R 26 (37)				B 45 (63)			
Правобережье 19		Заволжье 7		Правобережье 11		Заволжье 34	
яДНК – ген SA интрон I							
R(RR) 56 (79)		H(RB) 15 (21)				B(BB) –	
Правобережье 28		Заволжье 28		Правобережье 2		Заволжье 13	
–		–		–		–	
Комбинация маркеров – яДНК/мтДНК							
R(RR)/R 22 (31)		R(RR)/B 34 (48)		H(RB)/R 4 (6)		H(RB)/B 11 (15)	
Правобережье 17		Заволжье 5		Правобережье 11		Заволжье 23	
–		–		–		–	
–		–		2		2	
–		–		–		11	

Кроме того, только треть исследованных озерных лягушек (31%) имеет видоспецифичную для *P. ridibundus* комбинацию маркеров мт- и яДНК (R/R), т.е. диагностируется как генетически «чистая» «западная» форма. Остальные две трети лягушек имеют гибридное происхождение. Меньшая часть из них представлена гетерозиготными по маркеру яДНК экземплярами с мтДНК «западной» (H/R – 6%) или «восточной» (H/B – 15%) форм. Такое сочетание маркеров не противоречит отнесению их к гибридам первого поколения (F₁). Однако генетически «чистые» особи «восточной» формы, имеющие специфичные для *P. cf. bedriagae* маркеры мт- и яДНК (B/B), среди исследованных экземпляров не выявлены (табл. 1). При отсутствии одной из родительских форм более вероятно, что гетерозиготные особи являются не гибридами F₁, а результатом выщепления при возвратных скрещиваниях и беккроссах. С этим согласуется и большая доля лягушек (48%) совмещающих в генотипе маркеры двух форм – яДНК «западной» формы и мтДНК «восточной». Такая комбинация маркеров (R/B) может возник-

нуть лишь при возвратных скрещиваниях гибридных экземпляров.

Географическое распределение гаплотипов мт- и яДНК показано на рисунке. Видно, что «восточная» форма полностью оправдывает свое название, т.к. именно в заволжской части исследованного района преобладают специфичные для этой формы гаплотипы мтДНК (рис. А). Также в левобережной части располагается большая часть водоемов, в которых обитают особи несущие аллели яДНК «восточной» формы (рис. Б). Роль Волги в закономерностях распределения аллелей разных форм озерной лягушки подтверждается статистически. По данным анализа мтДНК соотношение «западных» и «восточных» гаплотипов приблизительно составляет 2:1 на правом берегу Волги (n=30) и 1:7 в Заволжье (n=41). В том же направлении возрастает доля «восточных» аллелей яДНК – от 3% на Правобережье, до 16% в Заволжье. Различия соотношений «западных» и «восточных» аллелей на двух берегах Волги достоверны в большей степени для митохондриальной ($p = 0,0001$) и в меньшей для ядерной ($p = 0.01$) ДНК.

А



Б

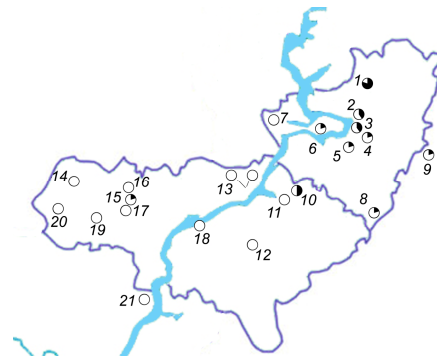


Рис. Распространение гаплотипов митохондриальной (А) и ядерной (Б) ДНК у озерных лягушек в районе исследования. «Западная» форма – прозрачный пунсон, «восточная» – залитый пунсон

Как указывалось выше, все исследованные экземпляры озерных лягушек делятся на две группы – «чистые» особи «западной» формы, с комбинацией маркеров мт- и яДНК (R/R) и «гибридные» экземпляры – гетерозиготные (H/R, H/B) или совмещающие маркеры двух форм (R/B). На правом берегу Волги доля озерных лягушек «западной» формы несколько выше, чем «гибридов» – 57% и 43%, соответственно. В Заволжье доля особей «западной» формы резко снижена (12%) и большинство экземпляров представлено «гибридами»

(88%). Различия между берегами достоверны ($p = 0,0001$).

Мы также попытались оценить, существует ли зависимость биотопического распределения от генотипа исследованных озерных лягушек. Данные (табл. 3) показывают, что частота аллелей «восточной» формы возрастает в антропогенных водоемах по сравнению с естественными, а также в открытых водоемах по сравнению с полуоткрытыми и закрытыми. Однако эта зависимость выявлена пока лишь на уровне тенденции, так как не имеет значимой статистической поддержки.

Таблица 3. Биотопическое распределение генетически типированных озерных лягушек (n=71)

Тип водоема	Естественный				Антропогенный				ИТОГО абс. (%)
	R/R	R/B	H/R	H/B	R/R	R/B	H/R	H/B	
Открытый	1	4	–	1	2	8	–	6	22 (31)
Полуоткрытый	7	6	–	1	8	7	3	2	34 (48)
Закрытый	2	3	1	–	2	6	–	1	15 (21)
ИТОГО абс. (%)	10 (14)	13 (18)	1 (1)	2 (3)	12 (17)	21 (30)	3 (4)	9 (13)	71 (100)

Данные настоящего исследования, согласуются с данными полученными нами ранее для Пензенской области [2, 3], где также выявлено обитание двух криптических форм озерной лягушки, наличие гибридов между ними, а также асимметрия в распределении маркеров мт- и яДНК.

Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа озерных лягушек обитающих на территории Самарской и Саратовской областей значительно расширяют «поволжскую» зону симпатрии и гибридизации «западной» и «восточной» форм, а также указывают на роль Волги как возможного пути расселения «восточной» формы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет» в сфере научной деятельности на 2014 – 2016 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринов Д.В. // О криптических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. Вып. 8. С. 936-960.
2. Ермаков О.А., Закс М.М., Титов С.В. Диагностика и распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s.l. в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК) Вестник ТГУ. 2013. Т. 18, вып. 6. С. 2999-3002.
3. Закс М.М., Быстракова Н.В., Ермаков О.А., Титов С.В. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой международной молодежной конференции герпетологов России и сопредельных стран. СПб., 2013. С. 86-89.
4. Лада Г.А. Криптическое видообразование у бесхвостых амфибий русской равнины // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2013. Т. 18. № 3. С. 790-794.
5. Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Боркин Л.Я., Скоринов Д.В. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран // Вопросы герпетологии. Материалы Третьего съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского. СПб: 2008. С. 247-257.
6. 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.
7. Akin C., Bilgin C.C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S.N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., et al. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic // J Biogeogr. 2010. V. 37. P. 2111-2124.
8. Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Khalturin M.D., Lada G.A., Barissovsky A.G., Faizulin A.I., Kotserzhinskaya I.M., Novitsky R.V., Ruchin A.B. New data on the distribution of the two cryptic forms of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) in Eastern Europe // Russ. J. Herpetol. 2003. 10. № 1. P. 115-122.
9. Litvinchuk S.N., Crottini A., Federici S., De Pous Ph., Donaire D., Andreone F., Kalezić M.L., Džukić G., Lada G.A., Borkin L.J., Rosanov J.M. Phylogeographic patterns of genetic diversity in the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae), reveals evolutionary history, postglacial range expansion and secondary contact // Org Divers Evol. 2013. P. 433-451.
10. Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G.D., Hotz H. Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia) // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2009. V. 53. P. 784-791.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory Manual, V. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989. 479 p.
12. Stöck M., Moritz C., Hickerson M., Frynta D., Dujsebaveva T., Eremchenko V., Macey J.R., Papenfuss T.J., Wake D.B. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2006. N 41. P. 663-689.

DISTRIBUTION «WESTERN» AND «EASTERN» FORMS OF MARSH FROG *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* S. L. IN THE SAMARA AND SARATOV REGION (on data of analysis of mtDNA and nDNA)

© 2014 O.A. Ermakov¹, A.I. Fayzulin², M.M. Zaks¹, E.I. Kaybeleva³, F.F. Zaripova²

¹ Penza State University, Penza

¹ Institute of Ecology of Volga Basin, Togliatti

³ Saratov State University, Saratov

Molecular-genetic analysis of 71 specimen of marsh frog from 21 locality in Samara and Saratov regions and adjacent areas was made. It was established, that in the study area there are two genetically differentiated forms of marsh frogs – "eastern" and "western". Mismatch of frequencies of alleles of mitochondrial and nuclear DNA was revealed – most of the marsh frogs have nuclear DNA of "western" form and mitochondrial DNA of "eastern" form. The features of the geographical distribution of cryptic forms and their biotopic confinement were studied.

Key words: marsh frog, *Pelophylax ridibundus*, molecular-genetic markers, distribution, Samara Region, Saratov Region