

На правах рукописи



ИВАНОВ Александр Юрьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КРИПТИЧЕСКИХ ФОРМ
ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА**

Специальность 03.02.08 – Экология (биология)

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

ПЕНЗА 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пензенский государственный университет» на кафедре «Зоология и экология».

Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент,
Ермаков Олег Александрович

Официальные оппоненты: **Вершинин Владимир Леонидович**,
доктор биологических наук, профессор,
ФГБУН «Институт экологии растений
и животных УрО РАН», заведующий
лабораторией функциональной экологии
наземных животных;

Скоринов Дмитрий Владимирович,
кандидат биологических наук,
ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
научный сотрудник группы
микроэволюции генома и цитоэкологии

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт систематики
и экологии животных Сибирского отделения
Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита диссертации состоится 26 сентября 2019 г., в ____ часов,
на заседании объединенного диссертационного совета Д 999.222.03
на базе ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет»,
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государствен-
ный университет им. Н. П. Огарёва», ФГБОУ ВО «Саратовский националь-
ный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышев-
ского» по адресу: 440026, г. Пенза, ул. Красная, 40.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке
ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» и на сайте:
<https://dissov.pnzgu.ru/ecspertiza/biolog/ivanov>

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Леонова Наталья Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Бесхвостые земноводные (Anura) – наиболее разнообразные и многочисленные современные амфибии, играющие огромную роль в пищевых цепях экосистем и оказывающие существенное воздействие на биосферу. Решение вопросов, связанных с идентификацией видов, их распространением, путями естественного расселения, интродукцией и инвазиями, условиями, влияющими на популяционную изменчивость, имеет большое значение для теоретической и практической биологии. Среди бесхвостых земноводных нередки случаи выявления криптических видов, изучение которых является важным аспектом познания механизмов формирования биологического разнообразия. Слабые морфологические различия при значительной генетической дифференциации близких видов амфибий делают их удобными модельными объектами для молекулярно-генетических исследований. Особенно интересным в этом отношении является комплекс европейских зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* комплекс), включающий «линнеевский вид» – прудовую лягушку *P. lessonae*, гибридогенный таксон – съедобную лягушку *P. esculentus*, а также ряд криптических форм озерной лягушки *P. ridibundus* complex. Согласно существовавшим во второй половине XX в. представлениям, ареал озерной лягушки охватывал огромную территорию от Северной Африки и Европы до Западной и Центральной Азии (Банников и др., 1977). В последние полтора – два десятилетия сформировалось представление о *P. ridibundus* как о сложном комплексе криптических видов и эволюционных линий с невыясненным таксономическим статусом (Боркин и др., 2004; Plötner, 2005; Hotz et al., 2013; Akin, 2015). На территории бывшего СССР озерная лягушка представлена, по крайней мере, двумя формами, вероятно, видового статуса – «западной» (собственно *P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой, *P. cf. bedriagae*) (Akin et al., 2010; Plötner et al., 2010; Ермаков и др., 2013). Именно «восточная» форма озерной лягушки на территории Западной Европы является одним из основных видов инвазивных амфибий, негативно влияющих на автохтонную фауну – путем конкуренции, распространения болезней и генетического загрязнения местных видов в результате гибридизации (Dubey et al., 2014; Dufresnes et al., 2016, 2017).

Восточная часть ареала озерной лягушки занимает огромную территорию (Русская равнина, Крым, Кавказ, Урал), захватывающую несколько природных зон и широкий спектр биотопов с разным уровнем антропогенного стресса, что позволяет получить сравнительный материал по генетической изменчивости популяций в различных условиях среды. Вместе с тем здесь отсутствуют серьезные географические барьеры, препятствующие расселению видов. Однако степень изученности комплекса озерных лягушек в пределах рассматриваемой территории меньше, чем в западной части ареала. Остаются нерешенными вопросы о границах распространения «западной» и «восточной» форм и экологических факторах, их определяющих, ширине зоны гибридизации и соотношении частот специфических генетических маркеров в популяциях, об эволюционной истории и путях расселения генетических линий, а также вкладе криптических форм в образование гибридогенного вида – съедобной лягушки.

Цель работы. Изучение молекулярно-генетических и экологических особенностей распространения криптических форм озерной лягушки, их взаимоотношений и роли в формировании генетической структуры популяций съедобной лягушки.

Задачи исследования:

1. Разработать тест-системы с использованием метода мультиплексной полимеразной цепной реакции для идентификации всех видов европейских зеленых лягушек, включая криптические и гибридогенный, и скринингового мониторинга видового состава поселений.

2. Определить ширину зоны контакта и гибридизации криптических форм озерной лягушки и выявить в ней закономерности распределения частот специфичных молекулярных маркеров митохондриальной (мт) и ядерной (я) ДНК.

3. Выявить экологические факторы, определяющие распространение генетически дифференцированных форм озерной лягушки.

4. Провести филогеографический анализ для реконструкции путей расселения видов, возможных инвазий, а также выявления регионов, из которых были интродуцированы особи за пределы естественного ареала.

5. Выяснить вклад криптических форм озерной лягушки как родительского вида в формирование генетической структуры популяций гибридогенного вида – съедобной лягушки.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Озерная лягушка, обитающая в восточной части ареала, генетически разнородна и представляет собой комплекс из двух криптических форм.

2. Генетическая структура популяций озерной лягушки свидетельствует о том, что зона симпатрии и гибридизации «восточной» и «западной» форм занимает большую часть территории Русской равнины.

3. Распределение генетических маркеров криптических форм в восточной части ареала озерной лягушки в большей степени зависит от географических и климатических факторов, чем от факторов антропогенной природы.

4. История расселения «восточной» формы озерной лягушки на территорию Русской равнины связана с послеледниковой инвазией из кавказского рефугиума в северном направлении и происходящей в настоящее время интродукцией.

5. В формировании гибридогенного вида – съедобной лягушки – в большей мере принимает участие «западная» форма озерной лягушки, чем восточная.

Научная новизна. Впервые проведено исследование изменчивости генетической структуры популяций и популяционных систем озерных лягушек в восточной части ареала. Впервые изучена одна из самых широких гибридных зон среди амфибий и определена степень гибридизации криптических форм *P. ridibundus*. На массовом материале изучено распределение аллелей и гаплотипов двух форм озерной лягушки, и дана оценка влияния экологических факторов на распространение криптических форм. Изучены популяции интродуцентов и выяснены пути их расселения.

Научно-практическая значимость. Работа имеет теоретическое значение в плане анализа процесса формирования «скрытого биоразнообразия» на примере видового комплекса с обширным ареалом. Получены оригиналь-

ные данные о генетическом разнообразии и гибридизации озерных лягушек. Разработанные тест-системы идентификации морфологически сходных видов могут быть использованы для массового анализа в целях экологического мониторинга и выявления инвазий. Оценено влияние экологических факторов на популяционно-генетическую структуру криптических форм озерной лягушки на обширной территории. Филогеографический анализ позволил реконструировать пути расселения и инвазии озерных лягушек и выявил регионы – доноры интродукции. Результаты исследования позволяют их использовать в преподавании экологических и зоологических курсов в вузах.

Апробация. Материалы работы были представлены на пяти российских и международных конференциях: Российской конференции «Современные проблемы зоологии, экологии и охраны природы», посвященной памяти проф. А. Г. Банникова и 100-летию со дня его рождения (Москва, 2015), VI Всероссийской конференции с международным участием «Принципы и способы сохранения биоразнообразия» (Йошкар-Ола, 2015), Международной конференции «Актуальные проблемы изучения биологии внутренних вод», посвящённой 60-летию Института биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина (Ярославль, 2016), Российской конференции, посвященной 70-летию кафедры «Зоология и экология» и памяти проф. В. П. Денисова «Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных» (Пенза, 2016), VII съезде Герпетологического общества им. А. М. Никольского при РАН «Современное состояние и перспективы изучения и сохранения биоразнообразия земноводных и пресмыкающихся Евразии» (Махачкала, 2018) и на Международной конференции «Современные проблемы медицины и естественных наук» (Йошкар-Ола, 2019).

Реализация и внедрение результатов работы. Материалы работы использованы при выполнении базовой части государственного задания ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» в сфере научной деятельности на 2017–2019 гг. (проект 6.7197.2017/БЧ) и гранта РФФИ (18-04-00640). Результаты, полученные в ходе исследования, используются в учебном процессе Пензенского государственного университета при подготовке бакалавров по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» и магистров по направлению 06.04.01 «Биология».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 6 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК; 5 – в материалах конференций.

Личный вклад автора. Основные результаты, приведенные в диссертации, получены непосредственно автором. Использованный в работе материал частично собран автором в полевые сезоны 2014–2018 гг., остальные сборы предоставлены коллегами. Молекулярно-генетический анализ и обработка его результатов проведены автором самостоятельно. В совместных публикациях вклад автора составил 50–70 %.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 18 таблиц и 25 рисунков. Библиографический список содержит 195 источников, в том числе 140 на иностранных языках.

Благодарности. Выражаю благодарность коллегам, предоставившим материал для исследования: А. Д. Аскендерову (ДГУ, Махачкала), Р. И. Замалетдинову (К(П)ФУ, Казань), В. А. Корзикову (ЦГЭ, Калуга), О. В. Кукушкину (КНС-ПЗ, Феодосия), Г. А. Ладе и М. В. Пятовой (ТГУ, Тамбов), Б. А. Левину (ИБВВ РАН, Борок), С. Н. Литвинчуку (ЦИН РАН, Санкт-Петербург), С. М. Ляпкову (МГУ, Москва), А. Б. Ручину (Мордовский ГПЗ), А. В. Павлову (Волжско-Камский ГПЗ), А. О. Свинину (МарГУ, Йошкар-Ола), Е. П. Симонову (ИСЭЖ РАН, Новосибирск), А. И. Файзулину (ИЭВБ РАН, Тольятти). Искреннюю признательность выражаю О. А. Ермакову за всестороннюю помощь на всех этапах исследования и коллективу кафедры «Зоология и экология» Пензенского государственного университета за плодотворное общение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Использование молекулярно-генетических методов при изучении криптических видов на примере европейских зелёных лягушек

В главе 1 рассматриваются вопросы использования молекулярно-генетических методов анализа в систематике и филогеографии бесхвостых амфибий на примере представителей рода *Pelophylax* Fitzinger 1843, приведены примеры выявления криптических и гибридогенных видов, обсуждается проблема чужеродных видов амфибий и их влияния на аборигенную фауну.

Глава 2. Материал и методы исследования

Использованный в работе материал по двум криптическим формам озерной лягушки, съедобной и прудовой лягушкам, был частично собран автором в полевые сезоны 2014–2018 гг. Остальные сборы были предоставлены коллегами. Выборка озерных лягушек составила 1068 экз., собранных в 260 локалитетах (от Восточной Европы до Западной Сибири) из России, Белоруссии, Молдавии, Украины, Казахстана, Грузии, Азербайджана и Армении. Материал по съедобной и прудовой лягушкам представлен 147 экз. (35 локалитетов) и 125 экз. (29 локалитетов), соответственно.

В качестве образцов тканей для выделения ДНК брались первые фаланги пальцев задних конечностей или мазок эпителия ротовой полости, фиксированные в 96 % этаноле. С целью видовой идентификации представителей *Pelophylax esculentus* комплекса использовались два молекулярно-генетических маркера: для мтДНК – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы (*COI*, 652 п.н.), для яДНК – интрон 1 гена сывороточного альбумина (*SAI-1*, 1052 п.н.). Генетическое типирование всей выборки проведено с использованием оригинальных мультипраймерных ПЦР-систем на основе различий первичных последовательностей вышеуказанных маркеров (детали метода приведены в следующем разделе).

При расчете частот встречаемости гаплотипов учитывалось, что мтДНК является гаплоидной и может рассматриваться как один аллель, поэтому количество аллелей равно количеству экземпляров. Ядерная ДНК диплоидна,

содержит два аллеля одного гена, соответственно, доли аллелей и экземпляров той или иной формы различны в зависимости от соотношения гомо- и гетерозиготных особей. Различия частот аллелей оценивались с помощью критериев хи-квадрат (χ^2) и Фишера.

Для выявления экологических факторов, определяющих распространение генетически дифференцированных форм озерной лягушки, использовались корреляционный, факторный и дискриминантный анализ. Для каждого водоема, где выборка составляла более трех особей (всего 161 водоем), указывались 14 характеристик: соотношение в популяции лягушек частот гаплотипов мтДНК, аллелей яДНК, широта, долгота, затененность водоема, покрытие берега травянистой растительностью, тип водоема, происхождение водоема, проточность, степень антропогенной трансформации, изотерма июля, изотерма января, годовое количество осадков, степень урбанизации.

Для реконструкции путей расселения и определения уровней генетической дифференциации определены первичные последовательности второй субъединицы гена NADH-дегидрогеназы (*ND2*) мтДНК (1038 п.н.) у 106 экз. (10 % выборки) и фрагмента гена *SAI* яДНК (871 п.н.) у 38 экз. (3 % выборки). Последовательности выравнивали и редактировали вручную в программе BioEdit v.7.0 (Hall, 1999). Для анализа генетической изменчивости использовалась программа DnaSP v. 5.10.01 (Librado, Rozas, 2009); вычислялись следующие параметры: общее количество полиморфных позиций (S), общее количество мутаций (η), количество гаплотипов (H), разнообразие гаплотипов (h), разнообразие нуклеотидов на сайт (π), среднее количество нуклеотидных замен (K). Выбор модели, наилучшим образом описывающей эволюцию изучаемых последовательностей, и реконструкция филогенетических отношений методом максимального правдоподобия (ML) и ближайшего связывания (NJ), осуществлялись в программе MEGA v. 7 (Kumar et al., 2015). Построение сети гаплотипов осуществлялось методом медианного связывания (Median Joining, MJ) в программе PopART (Leigh, Bryant, 2015). Картирование пространственного распределения популяций выполнено в программе QGIS 2.12.3 (<http://qgis.osgeo.org>).

Сокращения аллелей и гаплотипов принятые в тексте: R – *P. ridibundus*, B – *P. cf. bedriagae*, L – *P. lessonae*.

Глава 3. Идентификация европейских зеленых лягушек с использованием мультипраймерной ПЦР-системы

Идентификация видов комплекса *Pelophylax esculentus* сопряжена с трудностями из-за их сходства по морфологическим признакам, но она необходима для экологического мониторинга, изучения интродукции и инвазии видов и для выработки стратегии их сохранения. Разработана оригинальная тест-система, позволяющая идентифицировать все виды комплекса, включая криптические и гибридогенный, без применения дорогостоящих методов секвенирования. Использовалась мультиплексная ПЦР-система, основанная на различиях первичных последовательностей гена *COI* мтДНК, а также гена *SAI-1* яДНК. Анализ 55 депонированных в BOLD и GenBank последовательно-

стей фрагмента гена *COI* мтДНК показал, что различия между тремя видами лягушек (*P. ridibundus*, *P. cf. bedriagae* и *P. lessonae*) составляют 2,8–3,2 % (17–21 нуклеотидных замен), из которых 1,7 % (11 замен) – маркерные, т.е. встречаются у всех экземпляров каждого вида. Аналогично для ядерного гена *SAI-1* проанализировано 42 последовательности, различия составили 1,6–2,7 % (16–29 замен), из которых 1,4 % (15 замен) – маркерные. Это позволило спроектировать два набора, включающих один общий и три видоспецифичных праймера, с учетом трех параметров: наличия в последовательностях видоспецифичных праймеров двух замен, расположения видоспецифичных праймеров на разном удалении от общего, близкой температуре отжига для всех праймеров. Видоспецифичные праймеры использовали вместе с общим в одной ПЦР-смеси (таблица 1). Визуальная идентификация видов и их гибридов проводилась путем электрофореза продуктов ПЦР в полиакриламидном геле (рисунок 1).

Таблица 1 – Праймеры мультиплексной ПЦР-тест системы идентификации видов *Pelophylax esculentus* complex

Название	Позиция	Последовательность (5'-3')	Температура отжига (°C)	Длина продукта (п.н.)	Специфичность
<i>COIF-Pb</i>	183-204	CTTTGGAAATTGACTCGTGCCA	63,8	440	<i>P. cf. bedriagae</i>
<i>COIF-Pl</i>	329-349	GAAGTGTGTACCCCCACTAG	63,7	294	<i>P. lessonae</i>
<i>COIF-Pr</i>	409-429	GCTGGGGTTTCATCAATTCTG	61,8	214	<i>P. ridibundus</i>
<i>COIR-Pu</i>	624-601	CCTGCRGGATCAAAAAATGTTT	63,6	–	Все три вида
<i>SA1R-Pb</i>	450-429	TTGTCCCTATACTAAGGTCAC	59,3	415	<i>P. cf. bedriagae</i>
<i>SA1R-Pl</i>	140-119	TACCGTACCGATATTTGTATGC	60,2	109	<i>P. lessonae</i>
<i>SA1R-Pr</i>	245-221	GATACAAATGATACATCCCACCT	61,0	210	<i>P. ridibundus</i>
<i>SA1F-Pu</i>	25-59	CCATACAAATGTGCTAAGTAGGTT	61,3	–	Все три вида

Для определения видовой принадлежности маркера мтДНК использовали общий обратный праймер *COIR-Pu*. Для идентификации *P. lessonae* применяли прямой праймер *COIF-Pl*, амплифицирующий продукты ПЦР длиной 294 п.н. Праймеры *COIF-Pr* и *COIR-Pb* использовали для идентификации мтДНК *P. ridibundus* (214 п.н.) и *P. cf. bedriagae* (440 п.н.) (таблица 1; рисунок 1, лунки 1–3).

Аналогично, для исследования яДНК применялся общий прямой праймер *SA1F-Pu*. Специфичные обратные праймеры *SA1R-Pl* (109 п.н.), *SA1R-Pr* (210 п.н.) и *SA1R-Pb* (415 п.н.) идентифицируют яДНК *P. lessonae*, *P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae*, соответственно (таблица 1; рисунок 1, лунки 4–6). Гибридные экземпляры (гетерозиготы) характеризовались наличием в лунке геля двух полос (ПЦР продуктов), специфичных для каждого из родительских видов (рисунок 1, лунки 7–9), что позволило выявлять как гибридов двух криптических форм озерной лягушки, так и идентифицировать, которая из этих форм является родительской для съедобной лягушки.

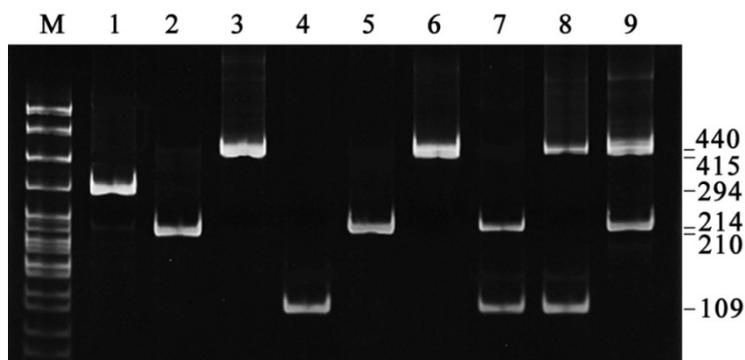


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР-реакции генов *COI* мтДНК (лунки 1–3) и *SAI-1* яДНК (лунки 4–9). 1, 4 –прудовая лягушка (*Pelophylax lessonae*); 2, 5 – «западная» форма озерной лягушки (*P. ridibundus*); 3, 6 – «восточная» форма озерной лягушки (*P. cf. bedriagae*); 7 – съедобная лягушка (*P. esculentus*, родительский вид «западная» форма); 8 – съедобная лягушка, (родительский вид «восточная» форма); 9 – гибрид «западной» и «восточной» форм озерной лягушки. М – маркер длин нуклеотидных последовательностей pBR/НраII. Справа приведены длины амплифицируемых фрагментов (п.н.).

Таким образом, разработанная тест-система молекулярной идентификации криптических и гибридного видов зеленых лягушек служит надежным способом определения криптических видов и их гибридов и может быть использована для массового анализа в научных и мониторинговых целях.

Глава 4. Генетическая структура популяций озерной лягушки в восточной части ареала по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК

В главе приводятся данные по изучению молекулярно-генетической структуры популяций озерной лягушки на территории Западного Кавказа (4.1), Северо-восточного Кавказа (4.2), Крыма (4.3), Поочья (4.4), Верхнего Поволжья (4.5), Зауралья (4.6), а также сведения о закономерностях распределения частот аллелей генетических маркеров в популяциях озерной лягушки восточной части ареала (4.7).

Молекулярно-генетическое типирование всей выборки выявило несоответствие частот распределения маркеров мт- и яДНК у озерных лягушек восточной части ареала. Результаты анализа маркера мтДНК показали почти двукратное преобладание в общей выборке ($n = 1068$) гаплотипов «восточной» формы (*P. cf. bedriagae*): В – 65 %, R – 35 %; исследования же маркера яДНК – преобладание аллелей «западной» формы (*P. ridibundus*): В – 38 %, R – 62 %. Различия частот встречаемости аллелей мт- и яДНК достоверны ($\chi^2 = 14,59$; $p = 0,0002$).

У озерной лягушки обнаружены все шесть возможных вариантов комбинаций маркеров мтДНК/яДНК: генетически «чистые» экземпляры с видоспецифичными маркерами – *P. ridibundus* – R/RR и *P. cf. bedriagae* – В/ВВ, гибридные (гетерозиготные) экземпляры – R/RB и В/RB, а также интрогрессивные комбинации, совмещающие в геноме маркеры двух форм– R/ВВ и

В/RR. На долю «чистых» видов приходится менее половины (44 %) исследованных экземпляров, остальные являются гетерозиготами (27 %) или содержат интрогрессивную комбинацию маркеров (28 %) (рисунок 2).

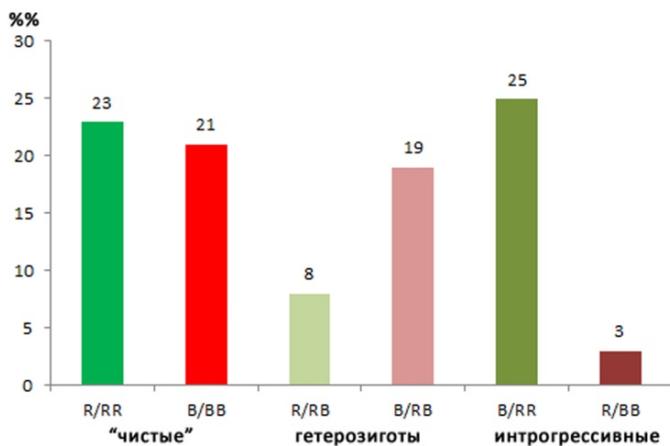


Рисунок 2 – Доли экземпляров озерных лягушек с различными комбинациями генетических маркеров мтДНК/яДНК.
R – *P. ridibundus*,
B – *P. cf. bedriagae*

Результаты анализа поселений ($n = 260$) озерных лягушек показали, что на изученной территории преобладают популяции, состоящие из особей гибридного происхождения. Более 70 % поселений состояли из гетерозигот и/или интрогрессивных особей, совмещающих митохондриальные и ядерные маркеры двух криптических форм. «Чистые» поселения, где все экземпляры имеют только видоспецифичные маркеры, встречаются в 4–6 раз реже. Их доли составили 16 % для «западной» формы и 11 % для «восточной» (рисунок 3).

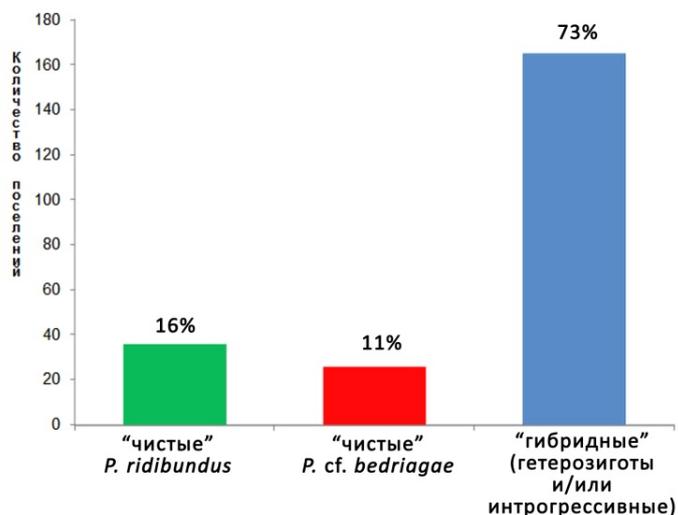


Рисунок 3 – Генетическая характеристика поселений ($n = 260$) озерных лягушек восточной части ареала

Распределение гаплотипов мтДНК показало, что «западная» форма озерной лягушки доминирует в поселениях западной части изученной территории. Практически во всех локалитетах, от западных границ бывшего СССР до Верхнего Поочья и бассейна р. Днепр к востоку, обитают озерные лягушки, имеющие только один тип мтДНК, специфичный для *P. ridibundus*. Гаплотипы мтДНК «восточной» формы преобладают у озерных лягушек, обитающих по обе стороны Кавказских гор, в Крыму, в Предкавказье, на север до Кумо-Манычской впадины. На остальной части изученного ареала, от р. Днепр

до Урала с запада на восток, и от Прикаспия до Верхнего Поволжья с юга на север, присутствуют гаплотипы обеих форм (рисунок 4). Размеры зоны симпатрии митохондриальных линий двух форм озерной лягушки составляют около 1700 км в долготном и 1200 км в широтном направлениях.

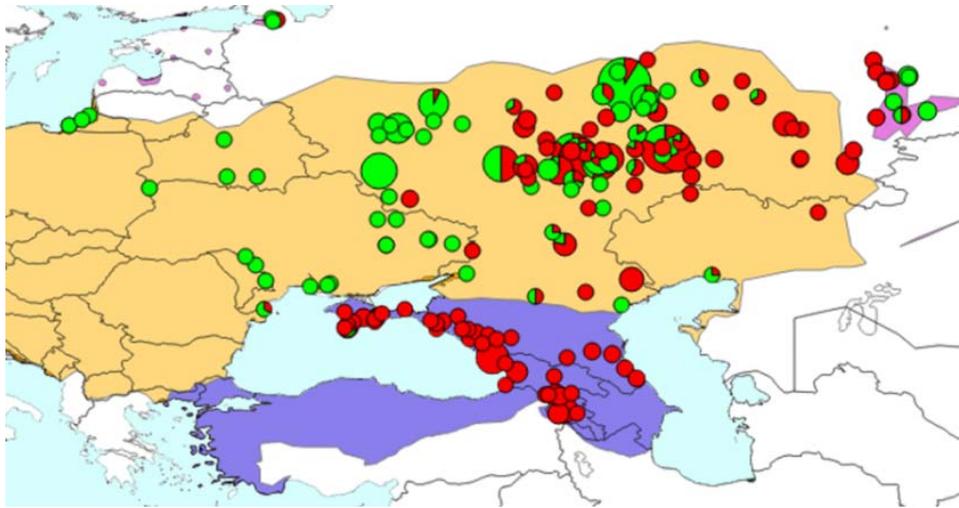


Рисунок 4 – Распределение частот гаплотипов мтДНК «западной» *P. ridibundus* (зеленый цвет) и «восточной» *P. cf. bedriagae* (красный цвет) форм озерной лягушки. Желтая заливка – ареал «западной» формы, фиолетовая – «восточной», розовая – зона интродукции. Размер пунсона соответствует количеству изученных экземпляров из каждого локалитета (от 1 до 15).

Географическое распределение аллелей яДНК не соответствует распределению гаплотипов мтДНК. На всей изученной территории в той или иной доле присутствуют аллели обеих форм, в том числе в районах, где обнаружена четкая дифференциация по митохондриальным линиям. Гетерозиготные экземпляры обнаружены как в западной части ареала, в пределах распространения «западной» митохондриальной линии, так и на Кавказе, где обитают озерные лягушки с гаплотипами мтДНК «восточной» формы (рисунок 5).

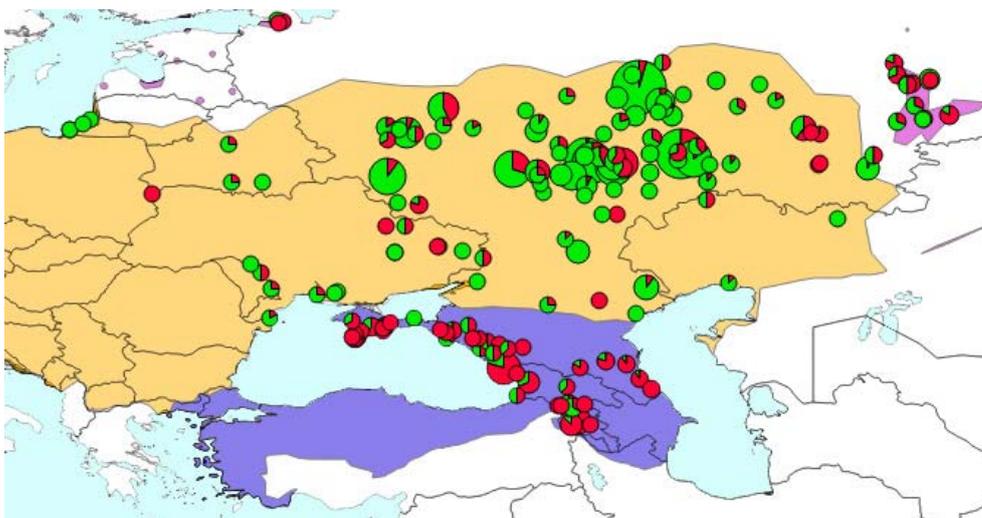


Рисунок 5 – Распределение частот аллелей яДНК «западной» и «восточной» форм озерной лягушки (обозначения см. рисунок 4)

На картах распределения маркеров двух генетически дифференцированных форм озерной лягушки (рисунок 4, 5) визуально просматривается определенная закономерность, заключающаяся в том, что на юге велика доля аллелей яДНК и гаплотипов мтДНК «восточной» формы. В широтном направлении, к северу, ее доля постепенно снижается. В долготном направлении, с запада на восток, прослеживается увеличение доли «восточной» формы по маркерам митохондриальной ДНК.

Гаплотипы мтДНК «восточной» формы на территории восточной части ареала комплекса *P. ridibundus* характерны для Кавказа и Крыма. Они преобладают в Заволжье и, в меньшей степени, на Правобережье Волги (таблица 2). Западной границей распространения митохондриальных гаплотипов формы «cf. bedriagae» на территории Восточно-Европейской равнины является бассейн р. Дон. мтДНК, специфичную для «западной» формы, имеют озерные лягушки, обитающие в центральной и восточной Европе (Plötner et al., 2008). По нашим данным, они также доминируют в популяциях бассейна Днепра и Дона и на Верхней Волге. Сходные результаты показал и анализ маркера яДНК. Бóльшая доля аллелей *P.cf. bedriagae* характерна для популяций озерных лягушек, обитающих на Кавказе и сопредельных территориях. К северу доля аллелей формы «cf. bedriagae» уменьшается, а доля «ridibundus» – увеличивается. В приобретенной в результате интродукции части ареала (Зауралье) показатели частот генетических маркеров подобны таковым Заволжской части ареала.

Таблица 2 – Соотношение «ridibundus» (R) и «cf. bedriagae» (B) гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК у озерных лягушек в изученных регионах, *n* – количество экземпляров

Регион	<i>n</i>	mtДНК (%)		<i>n</i>	яДНК (%)	
		R	B		R	B
Бассейн Дона и Днепра	110	97	3	220	75	25
Верхняя Волга	74	84	16	148	97	3
Правобережье Волги	327	81	19	654	43	57
Заволжье	144	17	83	288	81	19
Крым	191	12	88	382	22	78
Кавказ	166	0	100	332	29	71
Зауралье (зона интродукции)	56	27	73	112	47	53

Различия между сравниваемыми регионами по доле частот генетических маркеров в популяциях озерной лягушки статистически поддержаны ($p < 0,05$) как по данным анализа мтДНК, так и по яДНК, за исключением пар сравнения Заволжье – Крым, Заволжье – Урал (по частотам гаплотипов мтДНК) и бассейн Дона и Днепра – Заволжье, Зауралье – Правобережье (по частотам аллелей яДНК).

Глава 5. Экологические факторы, влияющие на распространение криптических форм озерной лягушки

Озерная лягушка – экологически пластичный вид, использующий очень широкий спектр биотопов (Кузьмин, 2012). Известно, что вид предпочитает

селиться в крупных водоемах «открытого» типа: по берегам и заливам крупных и средних рек, водохранилищ, озер, проникая в лесные массивы лишь по рекам, однако она не достигает в лесных водоемах высокой численности (Ручин и др., 2009). Интересной проблемой является выяснение вопроса, насколько генетическая структура популяций озерных лягушек, обитающих в конкретном водоеме, обусловлена свойствами этого местообитания.

5.1. Парный корреляционный анализ выявил поддерживаемые связи ($p < 0,001$) между соотношением частот генетических маркеров двух форм озерной лягушки и 7 из 12 изученных характеристик биотопа – по степени убывания «тесноты связи»: географические (широта, долгота), климатические (изотермы января и июля, осадки), антропогенные (степени антропогенной трансформации и урбанизации). Например, для «восточной» формы, происхождение и основной ареал которой расположен в Малой Азии (Akin, 2015), обнаружена отрицательная корреляция, указывающая на уменьшение доли частот генетических маркеров формы «cf. *bedriagae*» по направлению к северу, и положительная корреляция, связанная с температурой января (рисунок 6).

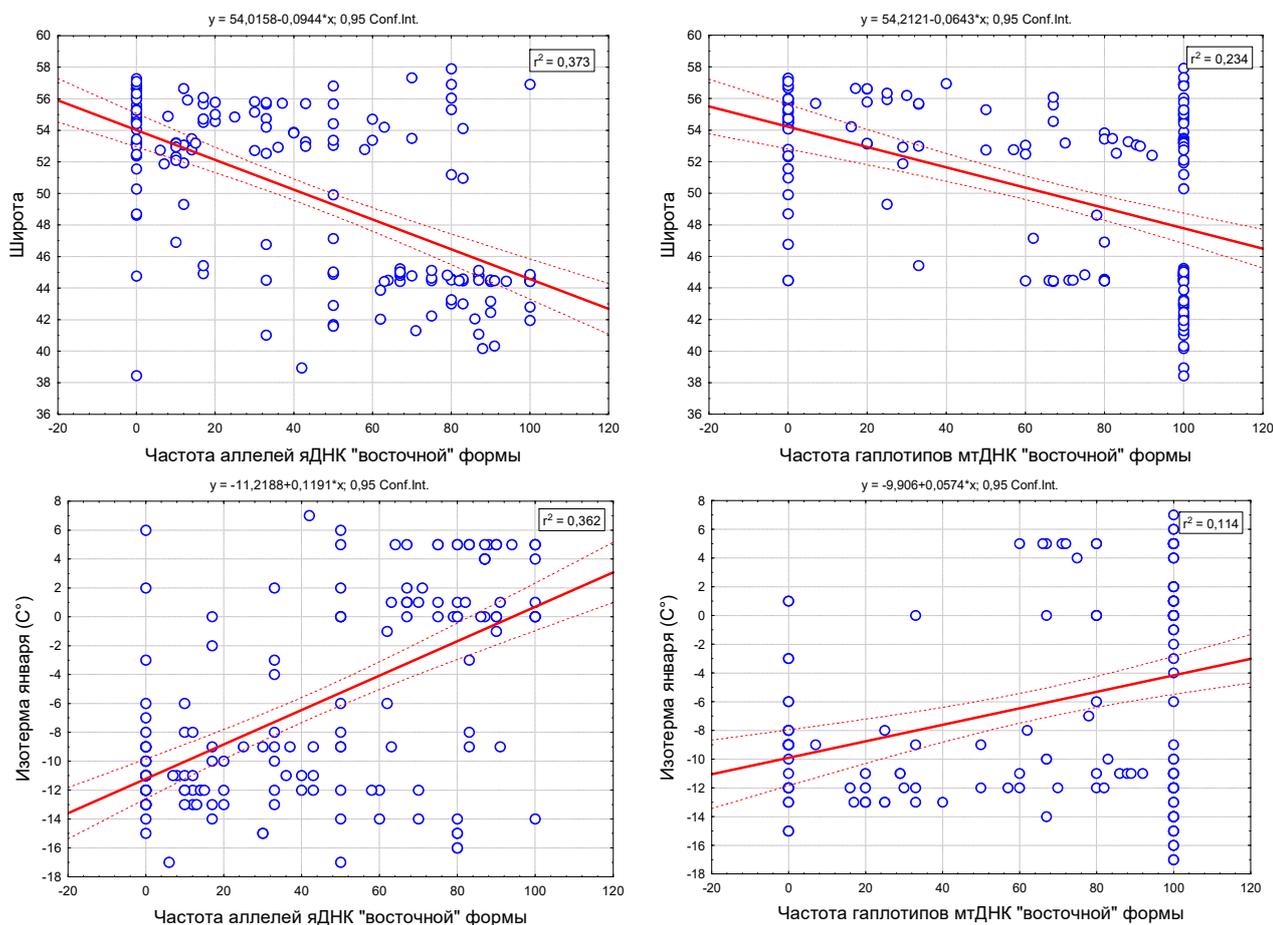


Рисунок 6 – Графики рассеивания, показывающие зависимость доли частот генетических маркеров «восточной» формы от географической широты и изотермы января

Соответственно, корреляционные связи географического распределения маркеров «западной» формы имеют аналогичную, но обратную корреляцию.

Остальные характеристики биотопа (затененность, покрытие берега, тип и происхождение водоема, проточность, годовая сумма осадков) показали слабую связь ($r < 0,3$) или были незначимыми ($p > 0,05$).

5.2. Факторный анализ (метод главных компонент) биотопических показателей «чистых» поселений озерных лягушек каждой форм и смешанных (с преобладанием генетических маркеров одной из них) проводили при условии формирования четырех факторов, описывающих наиболее важные особенности биотопа, а также для объединения признаков, совместно влияющих на распространение криптических форм. Результаты распределения факторных нагрузок показаны в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты факторного анализа (метод главных компонент) биотопических показателей местообитаний озерных лягушек (выделены факторы, вошедшие в кластер нагрузок)

Биотопические показатели	Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3	Фактор 4
Широта	0,926	0,059	- 0,118	- 0,074
Долгота	0,561	0,463	0,187	- 0,060
Затененность	0,102	- 0,709	0,092	0,425
Покрытие берега	0,391	- 0,636	- 0,055	0,349
Тип водоема	0,040	0,077	0,838	- 0,055
Происхождение водоема	0,108	0,239	- 0,557	- 0,196
Проточность	- 0,085	- 0,098	0,930	0,049
Степень антропогенной трансформации	0,267	0,831	- 0,117	0,145
Изотерма июля	- 0,743	0,042	0,048	- 0,007
Изотерма января	- 0,938	- 0,204	- 0,010	0,141
Годовое количество осадков	-0,312	0,089	0,043	0,805
Степень урбанизации	0,349	0,801	- 0,018	0,200
Собственные числа	3,080	2,582	1,956	1,085
% общей дисперсии	30,3	17,9	15,8	8,5

Первые два фактора объясняют 48,2 % общей дисперсии. По первому фактору максимальная нагрузка выявлена для географической широты, изотермы января и июля. Второй фактор показал совместное влияние затененности водоема и степени его антропогенной трансформации и урбанизации. Таким образом, показатели нагрузки первого фактора достаточно хорошо описывают комплекс географических и связанных с ними климатических переменных, а второй фактор относится к ландшафтно-биотопическим характеристикам, что подтверждает предыдущие результаты корреляционного анализа. Третий и четвертый факторы, на долю которых приходится всего 24,3 % общей дисперсии, связаны с типом, проточностью водоема и годовым количеством осадков.

Распределение признаков по осям, представляющим результаты факторных нагрузок (рисунок 7), подтверждает разделение признаков на географические и экологические, расположенные вдоль осей координат: географические вдоль оси X, экологические вдоль оси Y.

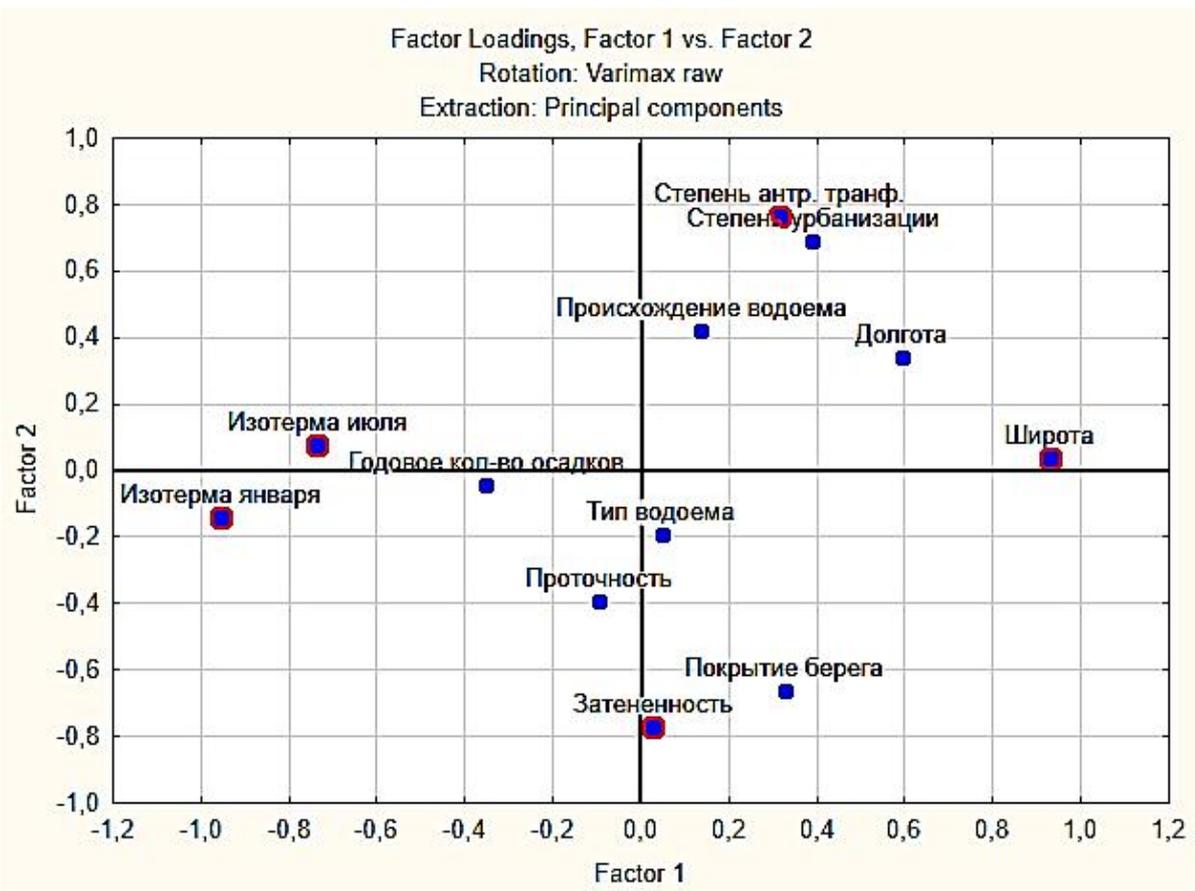


Рисунок 7 – Расположение биотопических показателей местообитаний озерных лягушек в ортогональном векторном пространстве (Factor 1, Factor 2) по результатам факторного анализа (метод главных компонент). Красным обведены факторы, вошедшие в кластер нагрузок

5.3. Дискриминантный анализ применялся для выяснения вопроса, по каким экологическим характеристикам местообитаний различаются популяции озерных лягушек двух криптических форм. Результаты анализа по трем выделенным группам поселений (1 – «чистые» *P. ridibundus*, 2 – «чистые» *P. cf. bedriagae*, 3 – смешанные, включающие гибридных и/или интрогрессивных особей во всех возможных комбинациях) показали, во-первых, расхождение экологических ниш «чистых» поселений двух форм озерных лягушек, во-вторых, что смешанные поселения, включающие гибридных и интрогрессивных особей, могут занимать весь спектр экологических ниш, перекрывая ниши «чистых» поселений двух криптических форм озерной лягушки.

Таким образом, результаты использования трех статистических методов (корреляционного, факторного и дискриминантного анализа), позволили установить, что основными экологическими факторами, определяющими распространение криптических форм озерной лягушки, являются географические (широта), климатические (изотермы июля и января), и в меньшей степени антропогенные факторы (степень антропогенной трансформации), а также ландшафтные свойства биотопа (проточность, тип водоема и его затененность).

Глава 6. Генетическое разнообразие и история расселения озерных лягушек восточной части ареала

С целью изучения генетического разнообразия и филогеографической структуры у озерных лягушек двух криптических форм определены первичные последовательности гена *ND2* мтДНК ($n = 106$) и *SAI-1* яДНК ($n = 38$). Различия (p -distance) между *P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae* составили $6,5 \pm 0,8$ % по маркеру мтДНК и $3,5 \pm 1,3$ % по маркеру яДНК, что сопоставимо с дистанциями между основными гаплогруппами зеленых лягушек, выделяемыми С. Akin (2015), и соответствуют видовому уровню дифференциации. Филогенетические реконструкции, полученные с помощью метода максимального правдоподобия (ML), построенные по маркерам мт- и яДНК, дифференцируют клады «восточной» и «западной» форм с высоким уровнем поддержки (96–100 %) (рисунок 8).

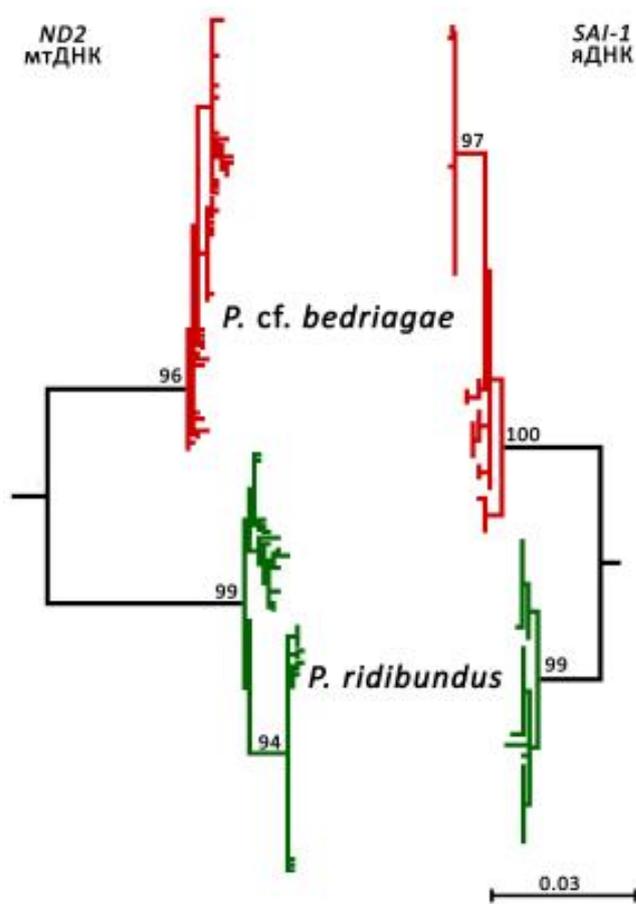


Рисунок 8 – Дендрограмма филогенетических отношений двух криптических форм озерной лягушки по результатам анализа последовательностей генов *ND2* мтДНК и *SAI-1* яДНК методом максимального правдоподобия (ML). Приведены бутстрэп поддержки при ML-анализе выше 90 %

Показатели генетического разнообразия «западной» и «восточной» форм приведены в таблице 4. У обеих форм наблюдается высокий уровень гаплотипического разнообразия при низком уровне разнообразия нуклеотидов. Нуклеотидное разнообразие «западной» формы достоверно выше, чем «восточной» ($p < 0,001$). Достоверные негативные значения F_s -теста у *P. cf. bedriagae* свидетельствуют в пользу относительно недавнего увеличения численности популяции и расширения ареала.

Таблица 4 – Генетическое разнообразие в выборках двух криптических форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* complex по данным секвенирования гена ND2 мтДНК и фрагмента гена SAI-1

Таксоны	n	H	$h \pm SD$	$\pi \pm SD$	S/η	K	Fu's Fs
ND2 мтДНК							
<i>P. ridibundus</i>	71	28	0,828 ± 0,042	0,0074 ± 0,0005	38/38	7,685	- 5,56
<i>P. cf. bedriagae</i>	73	33	0,927 ± 0,018	0,0039 ± 0,0002	40/40	4,089	- 21,45*
SAI-1 яДНК							
<i>P. ridibundus</i>	29	8	0,793 ± 0,039	0,0037 ± 0,0003	12/12	3,118	0,135
<i>P.cf. bedriagae</i>	48	9	0,728 ± 0,056	0.0019 ± 0,0003	9/9	1,574	- 2,178

Примечание. n – объем выборки (использованы оригинальные данные и последовательности GenBank NCBI); H – число гаплотипов; h – разнообразие гаплотипов; π – разнообразие нуклеотидов (на сайт); S – общее число полиморфных позиций; η – общее число мутаций; K – среднее количество нуклеотидных замен, Fu's Fs – значение Fs-теста. * – статистическая достоверность $p < 0.02$.

На сетях гаплотипов как «западной» (рисунок 9,а), так и «восточной» (рисунок 9,б) формы прослеживается разделение на две филогруппы. Одна из филогрупп «западной» формы по данным секвенирования соответствует балканской озерной лягушке (*P. kurtmuelleri*), чей видовой статус является предметом дискуссий, вторая – собственно *P. ridibundus* sensu stricto.

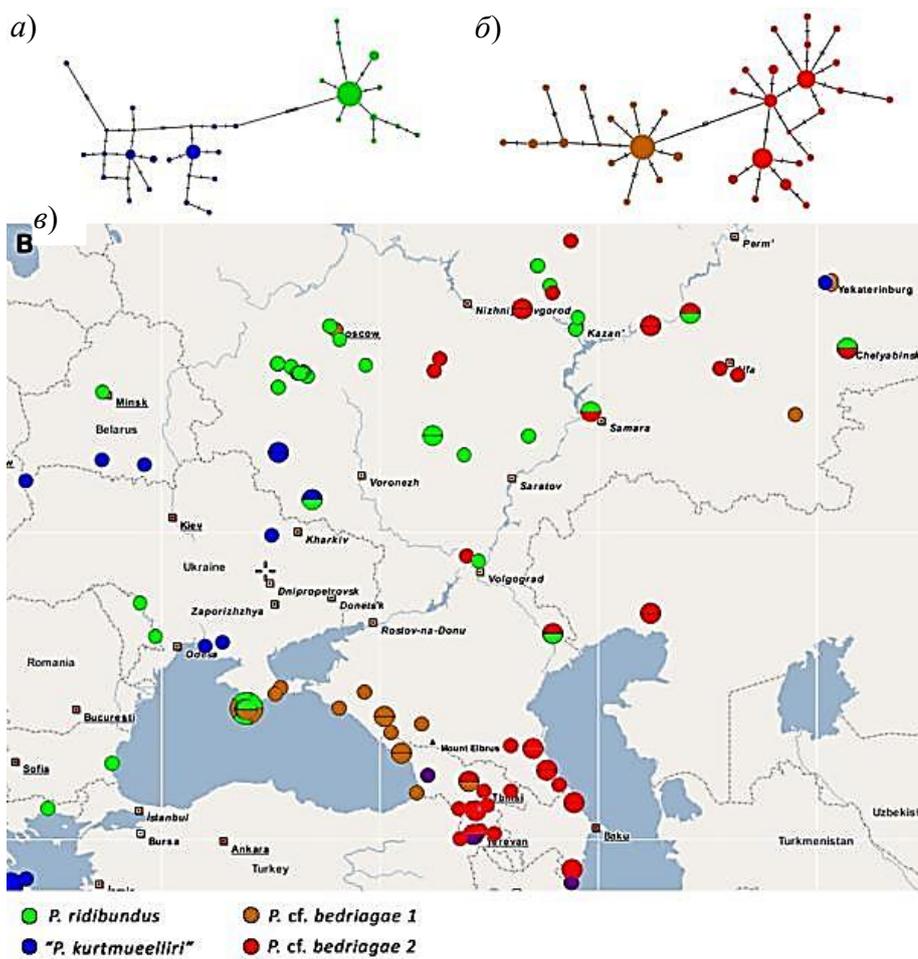


Рисунок 9 – Сеть гаплотипов мтДНК *P. ridibundus* (а), *P.cf. bedriagae* (б) и карта локалитетов секвенированных экземпляров (в). Цвет пунсонов обозначает выделенные группы гаплотипов

Отметим, что балканская озерная лягушка, отмеченная ранее в Причерноморье и Польше (Kolenda et al., 2017), по нашим данным распространена в восточном направлении гораздо шире, достигая бассейна р. Днепр и его притоков. У «восточной» формы, по сравнению с «западной», дистанция между двумя филогруппами меньше, однако их географическая структурированность выражена сильнее. Расположение выделенных филогрупп на карте (рисунок 9,в) позволяет реконструировать два предполагаемых пути расселения «восточной» формы на север после окончания оледенений. Обитая в непосредственной близости, а иногда и синтопично в Закавказье, севернее, в Предкавказье, группы становятся географически изолированными. *P.cf. bedriagae* 1 населяет побережье Черного моря и Крым, *P.cf. bedriagae* 2 – побережье Каспия, Поволжье и Урал (рисунок 9,в).

Филогеографический анализ также позволил выявить регионы, из которых особи были интродуцированы за пределы естественного ареала. Гаплотипы мтДНК балканской озерной лягушки и черноморской линии «восточной» формы (*P.cf. bedriagae* 1) обнаружены в Свердловской области, что является подтверждением искусственного завоза.

Таким образом, расселение «восточной» формы на территорию Русской равнины происходило в основном за счет естественной инвазии, а не интродукции. То же относится и к форме «*kurtmuelleri*», случаи находок которой в Причерноморье ранее относили к результатам искусственного завоза. На наш взгляд, процесс интродукции имеет меньшее влияние на генетическую структуру популяций озерных лягушек по сравнению с естественной инвазией, за исключением территорий приобретенного ареала.

Глава 7. Роль криптических форм озерной лягушки в формировании гибридного вида – съедобной лягушки, в условиях трансгрессии экологических ниш

При антропогенной трансформации местообитаний, сведении лесных массивов и изменении водного режима водоемов нередко происходит изменение условий существования родительских видов (озерной и прудовой лягушек), имеющих различную биотопическую приуроченность. Это приводит к трансгрессии их экологических ниш и, соответственно, к синтопии. Прудовая лягушка приурочена к небольшим лесным водоемам, тогда как озерная лягушка встречается преимущественно в крупных водоемах «открытого» типа. В «экотонных» сообществах нередко встречается гибридный таксон съедобная лягушка, *P. esculentus*, формирующийся в результате гибридизации родительских видов. При этом остается неизвестной степень участия криптических форм озерной лягушки в формировании *P. esculentus*. Высказывалось предположение, что форма «*cf. bedriagae*» не образует полуклональных гибридов (Holsbeek et al., 2008, p: 5024).

Исследование выборки съедобной лягушки ($n = 147$) показало, что она имеет гаплотипы мтДНК преимущественно от прудовой лягушки (61,2 %), а также «западной» (30,6 %) и «восточной» (8,1 %) форм озерной лягушки. Аллели ядерного маркера *SAI-1* были также представлены «западным» (97 %) и «восточным» (3 %) вариантами, причем «восточный» встречался существенно реже. Вторым аллелем неизменно был вариант яДНК, характерный для прудовой лягушки.

На территории Русской равнины, в зоне распространения криптических форм озерной лягушки, теоретически возможно шесть вариантов генотипа съедобных лягушек: R/RL, B/RL, B/BL, R/BL, L/RL, L/BL. Результаты анализа показали, что основное участие в формировании съедобной лягушки на изученной территории принимает «западная» форма (рисунок 10, таблица 5). Максимальное количество экземпляров съедобной лягушки имели генотип L/RL, на втором месте находятся экземпляры с генотипом R/RL. На долю этих двух генотипов, в каждом из которых имеются аллели «западной» формы, приходится 90 % всех изученных особей *P. esculentus*. Аллели «восточной» формы присутствуют в генотипе оставшихся 10 % изученных особей. Соответственно, такая же тенденция отмечается и по числу поселений, где обитают особи с такими генотипами. Нами не был обнаружен один из теоретически возможных генотипов – L/BL, что можно объяснить отсутствием «чистых» поселений «восточной» формы в ареале прудовой лягушки – второго родительского вида *P. esculentus*, а также возможным наличием отбора против гибридов с генотипом L/BL.

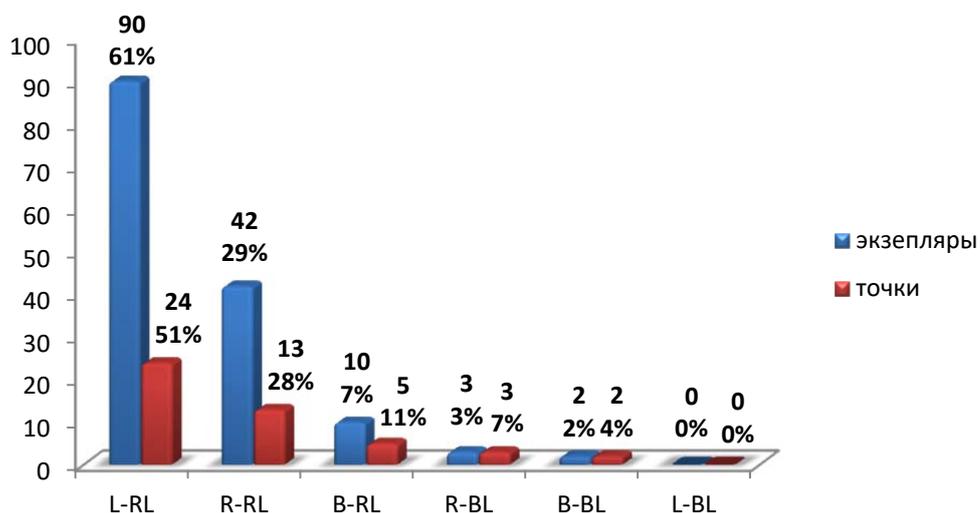


Рисунок 10 – Генетическая характеристика съедобной лягушки

Таблица 5 – Генетические характеристики озерных лягушек района исследований, R – аллели *P. ridibundus*, B – аллели *P. cf. bedriagae*, L – *P. lessonae*

Тип популяционной системы	Количество поселений	Экз. (n)	COI мтДНК				
			R		L	B	
			SAI-1 яДНК				
			RL	BL	RL	RL	BL
RE	6	8	–	2	6	–	–
REL	10	49	23	1	19	5	1
LE	12	77	19	–	55	2	1
неизвестен	7	13	–	–	10	3	–
Всего	35	147	42 (29%)	3 (2%)	90 (61%)	10 (7%)	2 (1%)

Среди 35 изученных популяционных систем преобладали системы смешанного REL-типа ($n = 10$) и LE-типа ($n = 12$), реже встречены системы RE-типа ($n = 6$) и неизвестного типа ($n = 7$). В популяционных системах REL-типа, в сравнении с системами LE-типа, статистически значимо ($\chi^2 = 15,65$; $p < 0,001$) преобладал гаплотип озерной лягушки (61,2 %), тогда как в системах LE типа – гаплотип прудовой (74,7 %). Подобное распределение мтДНК, наследующейся по материнской линии, явно связано с характером скрещиваний: в REL системах, по всей видимости, происходят скрещивания самок озерной лягушки и самцов прудовой. Вероятно, в LE системах самцы съедобной лягушки чаще всего скрещиваются с самками прудовой лягушки. Поддержание мтДНК озерной лягушки в популяционных системах LE-типа свидетельствует об участии гибридных самок в размножении.

В популяционных системах REL-типа наиболее часты варианты L/RL (38,7 %) и R/RL (46,9 %), тогда как в LE системах явно доминируют особи с генотипом L/RL (71,4 %). Остальные генотипы, включающие аллели и гаплотипы «восточной» формы озерной лягушки, оказываются весьма редкими: например, в RE системах B/BL – 2,0 %, B/RL – 10,2 %, R/BL – 4,1 %; в LE системах B/BL – 1,3 %, B/RL – 2,6 %, R/BL – 0,0 %.

ВЫВОДЫ

1. Скрининговый анализ выборки озерных лягушек, проведенный с использованием оригинальной тест-системы видовой идентификации, выявил, что в восточной части ареала озерная лягушка представлена двумя генетически дифференцированными криптическими формами – «западной» (собственно *P. ridibundus*) и «восточной» (анатолийской лягушкой, *P. cf. bedriagae*).

2. Результаты анализа генетической структуры популяций озерных лягушек показали, что большая часть территории Русской равнины является зоной симпатрии и гибридизации «западной» и «восточной» форм.

3. Выявлена географическая закономерность распределения генетических маркеров двух криптических форм озерной лягушки: на юге велика доля аллелей яДНК и гаплотипов мтДНК «восточной» формы, постепенно снижающаяся к северу.

4. Среди экологических факторов, определяющих распространение криптических форм озерной лягушки, преобладают географические и климатические, в меньшей степени – антропогенные факторы.

5. Результаты филогеографического анализа показали, что расселение «восточной» формы к северу по территории Русской равнины происходило в основном за счет процесса инвазии. Популяции озерной лягушки в Зауралье возникли в результате интродукции лягушек из Северного Причерноморья и Предкавказья.

6. В формировании гибридогенного вида – съедобной лягушки – основную роль играет «западная» форма озерной лягушки.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Молекулярно-генетическая характеристика лягушек *Pelophylax esculentus* комплекса на восточной периферии ареала (Поволжье, Республика Татарстан) / Р. И. Замалетдинов, А. В. Павлов, М. М. Закс, **А. Ю. Иванов**, О. А. Ермаков // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2015. – № 3 (31). – С. 54–66.

2. Распространение «западной» и «восточной» форм озёрной лягушки, *Pelophylax ridibundus*, и их участие в образовании полуклональных гибридов *P. esculentus* в республике Марий Эл / А. О. Свинин, **А. Ю. Иванов**, М. М. Закс, С. Н. Литвинчук, Л. Я. Боркин, Ю. М. Розанов, О. А. Ермаков // Современная герпетология. – 2015. – Т. 15, № 3/4. – С. 120–129.

3. Ермаков, О. А. Молекулярно-генетическая характеристика озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* республики Дагестан (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) / О. А. Ермаков, А. И. Файзулин, А. Д. Аскендеров, **А. Ю. Иванов** // Известия Самарского научного центра РАН. – 2016. – Т. 18, № 5. – С. 94–97.

4. Файзулин, А. И. Предварительные данные о молекулярно-генетической структуре *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura, Ranidae) южной части Крымского полуострова по результатам анализа митохондриальной и ядерной ДНК / А. И. Файзулин, О. В. Кукушкин, **А. Ю. Иванов**, О. А. Ермаков // Современная герпетология. – 2017. – Т. 17, № 1/2. – С. 56–65.

5. Кукушкин, О. В. О генетической неоднородности населения озерных лягушек Крыма, выявляемой по результатам анализа митохондриальной и ядерной ДНК (*Pelophylax (ridibundus) complex*; Anura, Ranidae) / О. В. Кукушкин, **А. Ю. Иванов**, О. А. Ермаков // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2018. – № 3(23). – С. 32–54.

6. The first record of natural transfer of mitochondrial DNA from *Pelophylax cf. bedriagae* into *P. lessonae* (Amphibia, Anura) / **A. Yu. Ivanov**, A. V. Ruchin, A. I. Fayzulin, I. V. Chikhlyayev, S. N. Litvinchuk, A. A. Kirillov, A. O. Svinin, O. A. Ermakov // Nature Conservation Research. Заповедная наука. – 2019. – Vol. 4(2). – P. 125–128.

Работы в других изданиях

7. Новые данные по распространению съедобной лягушки *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) в Марий Эл / А. О. Свинин, С. Н. Литвинчук, О. А. Ермаков, **А. Ю. Иванов**, Ю. М. Розанов // Принципы и способы сохранения биоразнообразия: материалы VI Всерос. конф. с междунар. участием. – Йошкар-Ола, 2015. – С. 108–111.

8. Молекулярно-генетическая характеристика озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* s.l. из верхнего Поочья / **А. Ю. Иванов**, В. А. Корзииков, С. К. Алексеев, О. А. Ермаков // Современные проблемы зоологии, экологии и охраны природы: материалы чтений и науч. конф., посвящ. памяти проф. Андрея Григорьевича Банникова и 100-летию со дня его рождения. – Москва, 2015 – С. 228–232.

9. Генетические формы озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus* complex) Западного Кавказа по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК / О. А. Ермаков, Е. П. Симонов, **А. Ю. Иванов**, Р. И. Замалетдинов, А. И. Файзулин // Молекулярная генетика гидробионтов : тр. Института биологии внутренних вод РАН. – 2016. – Вып. 73(76). – С. 70–76.

10. **Иванов, А. Ю.** Молекулярно-генетическая характеристика съедобной лягушки из Пензенской области / А. Ю. Иванов, М. М. Закс, О. А. Кириленко, О. А. Ермаков // Актуальные вопросы современной зоологии и экологии животных : материалы Всерос. науч. конф. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2016. – С. 43.

11. Молекулярно-генетическая характеристика гибридов зеленых лягушек на востоке ареала / **А. Ю. Иванов**, А. О. Свинин, М. М. Закс, В. А. Корзиков, А. И. Файзулин, Р. И. Замалетдинов, О. А. Ермаков // Современные проблемы медицины и естественных наук : сб. ст. междунар. науч. конф. – Йошкар-Ола, 2019. – Вып. 8. – С. 127–128.

Научное издание

ИВАНОВ Александр Юрьевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КРИПТИЧЕСКИХ ФОРМ
ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА**

Специальность 03.02.08 – Экология (биология)
(биологические науки)

Редактор *Е. Г. Акимова*
Технический редактор *Ю. В. Анурова*
Компьютерная верстка *Ю. В. Ануровой*

Распоряжение № 28/165 от 18.07.2019

Подписано в печать 18.07.2019. Формат 60×84¹/₁₆.
Усл. печ. л. 1,39. Заказ № 233. Тираж 100.

Издательство ПГУ.
440026, Пенза, Красная, 40.
Тел./факс: (8412) 56-47-33; e-mail: iic@pnzgu.ru

