

УДК 581/591(063)
ББК 28.59я4+28.69я4
М75

Молекулярная генетика гидробионтов / [отв. ред. Б.А. Лёвин]. – Ярославль : Филигрань , 2016. – 78 с. – (РАН, Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина. Труды ; вып. 73(76).

В. С. Артамонова, Е. А. Боровикова, И. С. Ворошилова, В. М. Голод, Е. С. Гусев, О. А. Ермаков, Р. И. Замалетдинов, А. Ю. Иванов, Д. А. Капустин, Б. А. Лёвин, Н. А. Мартыненко, А. А. Махров, Е. П. Симонов, А. И. Файзулин, В. А. Янковская

В выпуск вошли статьи по молекулярной генетике гидробионтов, относимых к двум царствам — хромистам (золотистые водоросли) и животным (моллюски, рыбы и амфибии), подготовленные по материалам докладов, представленных на Международной конференции Актуальные проблемы изучения биологии внутренних вод, посвященной 60-летию Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. В статьях представлены как обзоры, так и более частные работы по применению молекулярных маркеров для определения видов или популяций (пород рыб), реконструкции филогенетических отношений и филогеографического анализа, таксономической ревизии ряда групп.

Ответственный редактор тома
кандидат биологических наук **Б. А. Лёвин**

Рецензенты:

к.б.н. *Н. И. Абрамсон* – Зоологический Институт РАН
к.б.н. *А. А. Махров* – Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
к.б.н. *В. В. Ярцев* – Томский Государственный Университет

Редакционная коллегия Трудов ИБВВ РАН:

<i>С. А. Поддубный (главный редактор)</i>	<i>А. А. Бобров</i>
<i>А. В. Крылов (зам. главного редактора)</i>	<i>В. И. Лазарева</i>
<i>А. Н. Дзюбан</i>	<i>В. К. Голованов</i>
<i>В. Т. Комов</i>	<i>Н. М. Минеева</i>

*Печатается по решению Ученого совета ИБВВ РАН
Издание осуществлено при поддержке гранта РФФИ 16-04-20126*

Molecular genetics of aquatic organisms / [Editor-in-chief Boris A. Levin]. – Yaroslavl: Filigran, 2016. – 78 p. Transactions of I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, issue 73(76).

V. S. Artamonova, E. A. Borovikova, I. S. Voroshilova, V. M. Golod, E. S. Gusev, O. A. Ermakov, R. I. Zamaletdinov, A. Y. Ivanov, D. A. Kapustin, B. A. Levin, N. A. Martynenko, A. A. Makhrov, E. P. Simonov, A. I. Fayzulin, V. A. Yankovskaya

The issue includes papers on molecular genetics of aquatic organisms of different level of evolutionary organization belonging to two kingdoms – Chromista (Chrysophytes) and Animalia (mollusks, fishes, and amphibians). Both reviews and primary research papers concern different issues of species identification, molecular phylogeny and phylogeography, and taxonomy of certain groups.

Editor-in-chief of the volume
B. A. Levin

Reviewers:

Abramson N. I. – Zoological Institute, Russian Academy of Sciences
Makhrov A. A. – Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences
Yartsev V. V. – Tomsk University

Editorial board of IBIW RAS Transactions:

<i>S. A. Poddubny (editor-in-chief)</i>	<i>A. A. Bobrov</i>
<i>A. V. Krylov (deputy chief editor)</i>	<i>V. I. Lazareva</i>
<i>A. N. Dzyuban</i>	<i>V. K. Golovanov</i>
<i>V. T. Komov</i>	<i>N. M. Mineeva</i>

Published by the decision of IBIW RAS Academic council

The book is published by the grant RFBR 16-04-20126

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ОЗЁРНОЙ ЛЯГУШКИ (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* COMPLEX) ЗАПАДНОГО КАВКАЗА ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК

О. А. Ермаков¹, Е. П. Симонов^{2,3}, А. Ю. Иванов¹, Р. И. Замалетдинов⁴, А. И. Файзулин⁵

¹Пензенский государственный университет

440026 г. Пенза, ул. Красная, 40, e-mail: oaermakov@list.ru

²Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

152742 Ярославская обл., Некоузский р-н, п. Борок, ИБВВ РАН, e-mail: ev.simonov@gmail.com

³Томский государственный университет

634050 г. Томск, пр. Ленина, 36

⁴Казанский (Приволжский) федеральный университет

420008 г. Казань, ул. Кремлевская, 18, e-mail: i.ricinus@rambler.ru

⁵Институт экологии Волжского бассейна РАН

445003 Самарская обл., г. Тольятти, ул. Комзина, 10, e-mail: amvolga@inbox.ru

Проведен молекулярно-генетический анализ 73 особей *Pelophylax ridibundus* complex из 14 пунктов, расположенных на территории Краснодарского края, Республики Адыгея, Абхазии, Грузии и Армении по двум молекулярным маркерам — первой субъединице гена цитохром оксидазы (COI) мтДНК и первому интрону гена сывороточного альбумина (SAI-1) яДНК. Установлено, что у озерных лягушек, обитающих на Западном Кавказе, преобладает тип мтДНК специфичный для “восточной” формы (= анатолийская *P. cf. bedriagae*), единично отмечен вариант характерный для “евфратской” озерной лягушки (“Euphrates”), и полностью отсутствует тип мтДНК характерный для “западной” (= центрально-европейская *P. ridibundus*) формы. В тоже время анализ ядерного маркера показал присутствие в изученном регионе аллелей “западной” формы озерной лягушки, которые встречаются здесь значительно реже, чем “восточной”, в соотношении частот приблизительно равном 1:3.

Ключевые слова: озерная лягушка, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, цитохром оксидаза, сывороточный альбумин, Кавказ.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на основе молекулярно-генетических и биоакустических данных озерная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) рассматривается как комплекс видов (Боркин и др., 2004; Plötner, 2005; Plötner et al., 2008, 2012; Schneider, Sinsch, 1999). В Среднем и Нижнем Поволжье озерная лягушка представлена двумя генетически дифференцированными формами – “западной” (= центрально-европейская *P. ridibundus*) и “восточной” (= анатолийская *P. cf. bedriagae*) (Ермаков и др., 2013, 2014; Зак и др., 2013). На Кавказе “восточная” форма озерной лягушки впервые диагностирована на территории Армении по биоакустическим данным (Шнейдер, Егиазарян, 1989) и косвенно – по размеру генома (Литвинчук и др., 2008), кариологическим признакам (Martirosyan, Stepanyan, 2009) и размерным показателям эритроцитов и тела (Арзуманян и др., 2013). Кроме того, обитание *P. cf. bedriagae*, а также сестринской ей “евфратской” формы (“Euphrates”) на Кавказе и сопредельных территориях подтверждено анализом первичных последовательностей митохондриальных генов ND2 и ND3 (Akin et al., 2010). Для озерных лягушек Армении и Нагорного Карабаха отмечено наличие митохондриальных гаплотипов

(ND2, ND3) специфичных *P. cf. bedriagae* и ядерных аллелей (SA1, RanaCR1) двух форм – анатолийской и центрально-европейской *P. ridibundus* (Stepanyan et al., 2011). В задачи настоящего исследования входило изучение распределения маркеров митохондриальной и ядерной ДНК (далее мт- и яДНК) “восточной” и “западной” форм у озерных лягушек, обитающих на территории Армении, Грузии и причерноморской части Северного Кавказа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сбор материала проведен в 2014–2015 гг. Всего молекулярно-генетическим методом исследовано 73 особи из 14 пунктов, расположенных на территории Краснодарского края (1 пункт), Республики Адыгея (1), Абхазии (1), Грузии (3) и Армении (8) (табл. 1).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК методом высаливания (Aljanabi, Martinez, 1997) брали первые фаланги пальцев задних конечностей или мазок эпителия ротовой полости, фиксированные в 96% этаноле. Молекулярно-генетический анализ проведен в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета. Использовались 2 молекулярно-генетических маркера: для мтДНК — фрагмент первой субъ-

единицы гена цитохром оксидазы (COI), для яДНК — интрон 1 гена сывороточного альбумина (SAI-1). В первом случае, при помощи универсальных праймеров (Lisovsky et al., 2010) амплифицировался фрагмент гена COI, методом секвенирования определялась его первичная структура, а затем по видоспецифичным заменам проводился скрининговый рестрикционный анализ, позволяющий определять принадлежность гаплотипов мтДНК к “восточной” или “западной” форме (Ермаков и др., 2013). Во втором случае использовались праймеры из

работы Й. Плётнера с соавторами (Plötner et al., 2009), а видоспецифичные замены для рестрикционной диагностики форм определялись по первичной структуре интрона 1 гена SAI экземпляров *P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae* (Закс и др., 2013; Hauswaldt et al., 2012; Plötner et al., 2012) из базы данных GenBank NCBI. “Евфратская” озерная лягушка диагностировалась рестрикционным анализом на основе первичной последовательности второй субъединицы гена NADH-дегидрогеназы (ND2) мтДНК.

Таблица 1. Объем, места и годы сбора исследованных образцов

№	Локалитет	n	Координаты		Высота н.у.м., м	Год
			с.ш., °	в.д., °		
Россия						
1	Краснодарский край, окр. г. Геленджика	3	44.400	38.200	28	2014
2	Республика Адыгея, Майкопский р-н, пос. Каменномостский	1	44.261	40.166	355	2014
Абхазия						
3	окр. г. Сухум	17	43.000	41.000	9	2014
Грузия						
4	Самегрело и Земо-Сванети, окр. г. Абаша, р. Абаша	8	42.240	42.190	18	2015
5	Аджария, окр. г. Батуми, р. Чорох	3	41.592	41.597	34	2015
6	Шида-Картли, окр. г. Гори, р. Б. Лиави	4	42.035	44.068	631	2015
Армения						
7	Ширакская обл., окр. пос. Гарнарич, р. Кармиджур	1	41.084	43.609	2049	2015
8	Ширакская обл., окр. пос. Тавшут, лев. приток р. Ахурян	1	41.076	43.805	2027	2015
9	Лорийская обл., пос. Ташир, р. Ташир	8	41.091	44.169	1627	2015
10	Лорийская обл., пос. Степанаван, р. Дзорагет	6	41.013	44.383	1364	2015
11	Тавушская обл., окр. пос. Айрум, р. Дебед	1	41.206	44.905	505	2015
12	Армавирская обл., окр. г. Вагаршапат, р. Касах	8	40.178	44.265	885	2015
13	Котайская обл., окр. пос. Бюреган, р. Раздан	11	40.322	44.586	1271	2015
14	Гехаркуникская обл., окр. пос. Еранос, оз. Севан	1	40.213	45.235	1925	2015

Примечание: Номера, указанные перед адресом, соответствуют таковым на рисунке и в таблице 2.

ПЦР проводили в стандартной реакционной смеси в течение 30 циклов в обобщенном режиме: 94°C — 1 мин, 60°C — 1 мин, 72°C — 2 мин. ПЦР-фрагменты гидролизовали рестрикционными эндонуклеазами: *RsaI* (сайт GTAC) для гена COI, *HaeII* (RGCGCY) для гена ND2 мтДНК, *TasI* (AATT) и *TruI* (TTAA) для первого интрона гена SA яДНК. После рестрикции амплификационные смеси анализировали при помощи электрофореза в 6%-ном ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

При расчете частот встречаемости гаплотипов учитывалось, что мтДНК является гаплоидной и формально может рассматриваться как один аллель, поэтому количество аллелей и экземпляров равно. 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. Раз-

личия частот аллелей оценивались с помощью двустороннего критерия Фишера (F , two-tailed) в программе STATISTICA v.10 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа митохондриальной ДНК показали преобладание на территории Западного Кавказа митотипа, специфичного для “восточной” формы. Этот тип мтДНК отмечен у 97% исследованных озерных лягушек (71 экз. из 13 точек, табл. 2), что согласуется с полученными ранее сведениями о широком распространении *P. cf. bedriagae* в восточной части Средиземноморского региона и Причерноморье (Akin et al., 2010). Оставшиеся 3% (2 экз. из 2 точек) лягушек имели тип мтДНК характерный для “евфратской” формы (табл. 2), являющейся сестринской к *P. cf. bedriagae* s. s. с небольшим процентом различий, равным 1.8% (дистанция Тимуры-Нея по генам ND2 и ND3; Akin et al., 2010). “Евфратская” лягушка

распространена от Персидского залива на юге, вдоль бассейна рек Тигра и Евфрата, до восточной Турции и западного Ирана на севере (Akin et al., 2010; Pesarakloo et al., 2016), где встречается совместно с “восточной” формой. Наши находки “евфратской” формы в Армении указывают, что граница распространения проходит на 120 км севернее – до 41° с.ш. (рис.). При этом одна находка (точка № 8, Тавшут) расположена в верховьях бассейна реки Аракса, в средней и нижней части которого “евфратская” лягушка отмечена и по литературным

данным. Однако другая точка (№ 9, Ташир), находящаяся в 30 км к востоку, относится к бассейну Куры, что показывает возможность расселения особей с “евфратским” митотипом через невысокие нагорья, разделяющие бассейны этих рек – расстояние по прямой между истоками некоторых рек/ручьев, относящихся к разным бассейнам, составляет менее 9 км. Из 8 лягушек, отловленных в точке № 9, лишь у одной обнаружен специфичный для “евфратской” формы митотип, остальные 7 имели мтДНК “восточной” формы (табл. 2).

Таблица 2. Соотношение типов мт- и яДНК в выборках озерных лягушек ($n = 73$) Западного Кавказа

№	Локалитет	n	COI мтДНК		SAI-1 яДНК		
			В	“Е”	ВВ	BR	RR
1	Геленджик	3	3	–	–	2	1
2	Каменноостровский	1	1	–	–	1	–
3	Сухум	17	17	–	11	5	1
4	Абаша	8	8	–	4	3	1
5	Батуми	3	3	–	–	3	–
6	Гори	4	4	–	2	1	1
7	Гарнарич	1	1	–	1	–	–
8	Тавшут	1	–	1	1	–	–
9	Ташир	8	7	1	6	2	–
10	Степанаван	6	6	–	–	4	2
11	Айрум	1	1	–	1	–	–
12	Вагаршапат	8	8	–	6	2	–
13	Бюреган	11	11	–	10	–	1
14	Еранос	1	1	–	1	–	–
	ИТОГО	73	71	2	43	23	7
		(100%)	(97%)	(3%)	(59%)	(31%)	(10%)

Примечание: В — гаплотипы мтДНК и аллели яДНК “восточной” формы, “Е” — гаплотипы мтДНК “евфратской” формы, R — аллели яДНК “западной” формы.

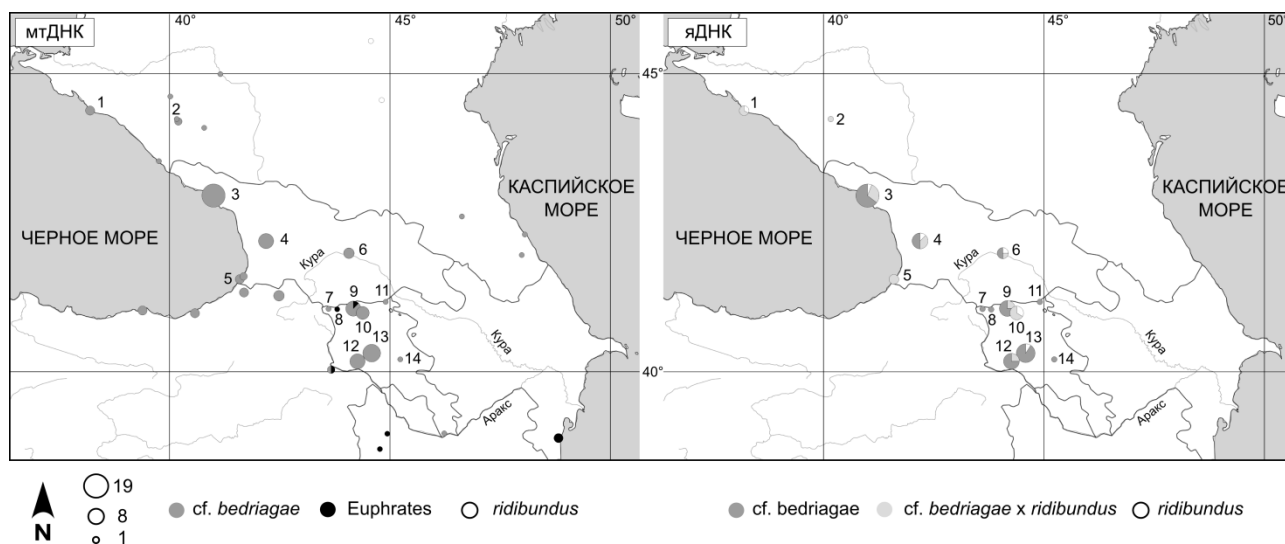


Рис. Распределение гаплотипов митохондриальной и аллелей ядерной ДНК у озерных лягушек Западного Кавказа. Номера точек соответствуют табл. 1 и 2, точки без нумерации – литературные данные (по: Akin et al., 2010).

Предполагается, что дивергенция двух рассматриваемых форм озерной лягушки произошла 1.1–1.0 млн. лет и связана со значительным похолоданием и изменениями рельефа на границах Анатолийской, Аравийской и Ев-

разийской плит, что привело к сокращению ареала и изоляции отдельных генетических линий (Akin et al., 2010; Plötner et al., 2010). В то же время малая генетическая дистанция, перекрывание ареалов и совместное обитание “вос-

точной” и “евфратской” митохондриальных форм, в том числе и на территории Западного Кавказа, свидетельствуют об их конспецифичности. Отметим, что особи с мтДНК характерной для “западной” формы, нами не обнаружены. Ближайшие места находок лягушек с мтДНК *P. ridibundus* s. s. отмечены севернее — на территории Ставропольского края и Астраханской области выше 44° с.ш. (Akin et al., 2010; наши неопубликованные данные).

Результаты анализа ядерной ДНК показали, что кроме аллелей гена SAI, характерного для “восточной” формы, у озерных лягушек Западного Кавказа встречаются аллели, специфичные для “западной” формы, при соотношении частот аллелей приблизительно равном 3:1. Большинство изученных особей (59%) являлись гомозиготами (BB) и диагностировались как “восточная” форма, 31% были гетерозиготами (BR) и 10% — гомозиготами (RR) “западной” формы (табл. 2). Однако при отсутствии в общей выборке “западного” типа мтДНК более вероятно, что особи, несущие оба специфичных для “западной” формы аллеля ядерного гена, являются результатом выщепления при скрещиваниях гетерозигот. С этим согласуется и тот факт, что практически все (6 из 7) гомозиготные особи RR-типа обнаружены в поселениях, где присутствуют гетерозиготные экземпляры. Наши данные позволяют предположить, что на территории Западного Кавказа нет “чистых” поселений лягушек “восточной” формы, т.к. во всех точках отлова, где выборка составила более одной особи, обнаружены аллели *P. ridibundus* s. s. (рис.). Кроме того, на уровне тренда прослеживается зависимость распределения частот аллелей от высоты над уровнем моря. В целом с увеличением высоты местности доля аллелей “западной” формы уменьшается: от соотношения частот приблизительно равного 2:1 на высотах менее 500 м н.у.м. до 4:1 — в локалитетах, расположенных на больших высотах ($\chi^2=4.45$, $p=0.0509$).

Полученные результаты выявили несоответствие частот распределения маркеров мт- и яДНК у озерных лягушек Западного Кавказа, а именно — отсутствие “западных” гаплотипов мтДНК при наличии “западных” аллелей в ядерном геноме. Если результаты анализа маркера мтДНК показали наличие в общей выборке только гаплотипов *P. cf. bedriagae* s. l., то исследования маркера яДНК выявили присутствие в выборке аллелей *P. ridibundus* s. s. на уровне 25%. Различия частот встречаемости аллелей мт- и яДНК двух форм достоверны ($\chi^2=20.49$, $p<0.0001$). Подобная ситуация может объясняться двумя причинами.

1) Дивергенция центрально-европейской и анатолийских озерных лягушек, рассчитанная по последовательностям маркеров мтДНК, произошла около 6 млн. лет назад и была связана с геодинамическими процессами, в первую очередь с началом Мессинского кризиса солёности (MSC) (Plötner et al., 2010; 2012). Во время последнего плейстоценового оледенения ареал *P. ridibundus* s. s. должен был значительно сократиться на севере и сдвинуться к югу, в том числе в Причерноморье и на Северный Кавказ. В пользу этой версии свидетельствует тот факт, что южная граница вечной мерзлоты в данной местности проходила в районе 48° с.ш. (Lindren et al., 2016), тогда как современный ареал озерной лягушки находится на значительном удалении от залегания вечной мерзлоты. Таким образом в ходе экспансии на юг *P. ridibundus* s. s. вступала в гибридизацию с *P. cf. bedriagae*, ареал которой также сокращался к югу. При этом Кавказские горы, очевидно, являлись существенным барьером для расселения амфибий, так как во время последнего оледенения на Кавказе (окончившемся примерно 11–10 тыс. лет назад), горные/долинные ледники и перегляциальная зона покрывали значительную часть главного Кавказского хребта (Gobejishvili et al., 2011). Средняя годовая температура была при этом на 7–8°C ниже современных показателей (Gobejishvili et al., 2011). Следовательно, единственным коридором для проникновения *P. ridibundus* s. s. в Закавказье на западе являлось Черноморское побережье, по которому «западная» форма начала свое расселение в Колхидскую низменность и за её пределы. При потеплении, в голоцене, “восточная” форма начала расселение на север и вытеснила “западную” озерную лягушку в процессе поглотительной гибридизации. Такой сценарий, согласующийся с историей климатических изменений в регионе, объясняет наличие клины с северо-запада на юго-восток в частоте встречаемости аллелей *P. ridibundus* s. s. на Западном Кавказе. Следы былой гибридизации обнаруживаются лишь в ядерном геноме в силу менделевского характера его наследования в отличие от мтДНК, наследуемой по материнской линии.

2) Возможно наличие у озерных лягушек Западного Кавказа двух вариантов ядерных маркеров (“западного” и “восточного”) является проявлением анцестрального полиморфизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом изучение генетических характеристик озерных лягушек Западного Кавказа подтвердило их принадлежность к митохондриальной гаплогруппе *P. cf. bedriagae* и

впервые выявило особей, имеющих мтДНК “евфратской” формы. Анализ ядерного маркера показал наличие в выборке значительной доли (25%) аллелей центрально-европейской

P. ridibundus, что позволяет говорить о широкой зоне вторичного контакта генетически дифференцированных форм.

Благодарности. Мы благодарны Н.М. Курмаевой (Пенза, ПГУ) за помощь в сборе материала. Особенно благодарны автору анонимному рецензенту за конструктивные замечания. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности ВИУ ТГУ. Исследование также поддержано Российским научным фондом (грант № 15-14-10020; сбор материала).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арзумян М.В., Варданян А.И., Степанян И.Э., Аракелян М.С. Межпопуляционная изменчивость по размерам тела и эритроцитов у озерной лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) в Армении // Современная герпетология: проблемы и пути их решения. Статьи по материалам докладов Первой международной молодежной конференции герпетологов России и сопредельных стран (Санкт-Петербург, Россия, 25–27 ноября 2013 г.) / Зоологический институт РАН. СПб., 2013. С. 44–47. Arzumanyan M.V., Vardanyan A.I., Stepanyan I.E., Arakelyan M.S. Mezhpopyulyacionnaya izmenchivost' po razmeram tela i eritrocitov u ozernoi lyagushki, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) v Armenii // Stat'i po materialam dokladov Pervoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferencii gerpetologov Rossii i sopredel'nyh stran (Sankt-Peterburg, Rossiya, 25–27 noyabrya 2013 g.) / Zoologicheskii institut RAN. SPb., 2013. S. 44–47. [Arzumanyan M.V., Vardanyan A.I., Stepanyan I. E., Arakelyan M.S. The interpopulation variability of sizes of body and erythrocytes of the marsh frog, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) from Armenia // Modern herpetology: problems and ways of their solutions. Collection of papers of the First International Conference of the Young Herpetologists of Russia and neighboring countries (Saint-Petersburg, Russia, 25–27 November 2013) / Zoological institute of RAS. Saint-Petersburg, 2013. P. 44–47.] In Russian
- Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скоринов Д.В. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. 2004. Т. 83. № 8. С. 936–960. Borkin L.Ya., Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Skorinov D.V. O kripticheskikh vidah (na primere amfibii) // Zoologicheskii zhurnal. 2004. T. 83. № 8. S. 936–960. [Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Skorinov D.V. On cryptic species (an example of amphibians) // Entomol. Rev. 2004. V. 84. №. 1. pp. S75–S98.]
- 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 Тамбовского университета. 2013. Т. 18. № 6. С. 2999–3002. Ermakov O.A., Zaks M.M., Titov S.V. Diagnostika i rasprostranenie “zapadnoi” i “vostochnoi” form ozernoi lyagushki *Pelophylax ridibundus* s. l. v Penzenskoi oblasti (po dannym analiza gena COI mtDNK) // Vestnik Tambovskogo universiteta. 2013. T. 18. № 6. S. 2999–3002. [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) // Tambov University Reports. 2013. V. 18. № 6. P. 2999–3002.] In Russian
- Ермаков О.А., Файзулин А.И., Закс М.М., Кайбелева Э.И., Зарипова Ф.Ф. Распространение “западной” и “восточной” форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. на территории Самарской и Саратовской областей (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. Т. 16. № 5(1). С. 409–412. Ermakov O.A., Faizulin A.I., Zaks M.M., Kaibeleva E.I., Zaripova F.F. Rasprostranenie “zapadnoi” i “vostochnoi” form ozernoi lyagushki *Pelophylax ridibundus* s. l. na territorii Samarskoi i Saratovskoi oblasti (po dannym analiza mitohondrial'noi i yadernoi DNK) // Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN. 2014. T. 16. № 5(1). S. 409–412. [Ermakov O.A., Fayzulin A.I., Zaks M.M., Kaybeleva E.I., Zaripova F.F. 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) // Proceedings of the Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences. 2014. V. 16. № 5(1). P. 409–412.] In Russian
- 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 (Санкт-Петербург, Россия, 25–27 ноября 2013 г.) / Зоологический институт РАН. СПб., 2013. С. 86–89. Zaks M.M., Bystrakova N.V., Ermakov O.A., Titov S.V. Molekulyarno-geneticheskaya i morfologicheskaya harakteristika ozernyh lyagushek (*Pelophylax ridibundus*) iz Penzenskoi oblasti // Stat'i po materialam dokladov Pervoi mezhdunarodnoi molodezhnoi konferencii gerpetologov Rossii i sopredel'nyh stran (Sankt-Peterburg, Rossiya, 25–27 noyabrya 2013 g.) / Zoologicheskii institut RAN. SPb., 2013. S. 86–89. [Zaks M.M., Bystrakova N.V., Ermakov O.A., Titov S.V. Molecular-genetic and morphological characteristics of marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) from the Penza region // Modern herpetology: problems and ways of their solutions. Collection of papers of the First International Conference of the Young Herpetologists of Russia and neighboring countries (Saint-Petersburg, Russia, 25–27 November 2013) / Zoological institute of RAS. Saint-Petersburg, 2013. P. 86–89.] In Russian

- 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. (9–13 октября 2006 г, Пушкино). СПб: 2008. С. 247–257. Litvinchuk S.N., Rozanov Yu.M., Borkin L.Ya., Skorinov D.V. Molekulyarno-biohimicheskie i citogeneticheskie aspekty mikroevolyucii u beshvostyh amfibii fauny Rossii i sopredel'nyh stran // Voprosy gerpetologii. Materialy Tret'ego s'ezda Gerpetologicheskogo obshestva im. A. M. Nikol'skogo. (9–13 oktyabrya 2006 g, Pushino). SPb: 2008. S. 247–257. [Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Borkin L.J., Skorinov D.V. Molecular, biochemical and cytogenetic aspects of microevolution in anurans of Russia and adjacent countries // The problems of herpetology. Proceedings of the 3th Meeting of the Nikolsky Herpetological Society (9–13 October 2006, Putschino). Saint-Petersburg, 2008. P. 247–257.] In Russian
- Шнейдер Г., Егиазарян Э.М. Биоакустические исследования озерных лягушек (*Ranidae: Rana ridibunda*) в Армении как вклад в изучение распространения восточной формы // Биолог. ж. Армении. 1989. № 9–10 (42). С. 926–935. Shneider G., Egiazyryan E.M. Bioakusticheskie issledovaniya ozernyh lyagushek (*Ranidae: Rana ridibunda*) v Armenii kak vklad v izuchenie rasprostraneniya vostochnoi formy // Biolog. zh. Armenii. 1989. № 9–10 (42). S. 926–935. [Schneider H., Egiazyryan E.M. Bio-acoustic research of marsh frogs (*Ranidae: Rana ridibunda*) in Armenia as a contribution to the study of the spread of Oriental forms // Biological J of Armenia. 1989. V. 42. № 9–10. P. 926–935.] In Russian
- 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. Vol. 37. P. 2111–2124. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2010.02368.x
- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25. P. 4692–4693.
- Gobejishvili R., Lomidze N., Tielidze L. Late Pleistocene (Würmian) glaciations of the Caucasus // Developments in Quaternary Science. 2011. Vol. 15. P. 141–147. DOI: 10.1016/B978-0-444-53447-7.00012-X
- Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M., Christiansen D.G., Dziewulska-Szwajkowska 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. Sep; 12 (5). P. 797–805. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x
- Lindgren A., Hugelius G., Kuhry P., Christensen T. R., Vandenberghe, J. GIS-based maps and area estimates of northern hemisphere permafrost extent during the Last Glacial Maximum // Permafrost Periglacial Process. 2016. Vol. 27(1). P. 6–16. DOI: 10.1002/ppp.1851
- Lisovsky A. A., Obolenskaya E. V., Abramson N. I., Dokuchaev N. E., Yakimenko V. V., Mal'kova M. G., Bogdanov A.S., Ivanova N. V. Geographic variation of *Microtus middendorffii* (Cricetidae, Arvicolinae, Rodentia) sensu lato studied by craniometrical and mitochondrial features // Russ. J. Theriol. 2010. Vol. 9(2). P. 71–81.
- Martirosyan A., Stepanyan I. Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 (Amphibia: Ranidae) from Armenia // Comp. Cytogenet. 2009. Vol. 3(1). P. 11–24. DOI: 10.3897/compcytogen.v3i1.4
- Pesarakloo A., Rastegar-Pouyani E., Rastegar-Pouyani N., Kami H., Najibzadeh M., Khosravani A., Oraie H. The first taxonomic reevaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome // Mitochondrial DNA. 2016. DOI: 10.3109/19401736.2015.1127362
- Plötner J. 2005. Die westpaläarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld. 160 s.
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs // J. Evol. Biol. 2008. Vol. 21. P. 668–681. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2008.01527.x
- 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) // Mol. Phylogenet. Evol. 2009. Vol. 53. P. 784–791. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.07.037
- Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C.C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Guex G.-D., Litvinchuk S.N., Westaway R., Reyer H.-U., Hotz H. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern Mediterranean water frogs. In: Glaubrecht M, Schneider H (Eds.), Evolution in action. Case studies in adaptive radiation and the origin of biodiversity. Special volume from the SPP 1127 “Radiations – Genesis of Biological diversity. SPP of the DFG. Springer, Heidelberg, Berlin, 2010. pp. 373–403. DOI: 10.1007/978-3-642-12425-9_18
- Plötner J., Baier F., Akin C., Mazepa G., Schreiber R., Beerli P., Litvinchuk S.N., Bilgin C.C., Borkin L., Uzzell T. Genetic data reveal that water frogs of Cyprus (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin // Zoosyst. Evol. 2012. Vol. 88 (2). P. 261–283. DOI: 10.1002/zoos.201200021
- Schneider H., Sinsch U. Taxonomic reassessment of Middle Eastern water frogs: bioacoustic variation among populations considered as *Rana ridibunda*, *R. bedriagae* or *R. levantina* // J. Zool. Syst. Evol. Res. 1999. Vol. 37. P. 57–65.
- Stepanyan I., Schreiber R., Plötner J. On the systematic status of water frogs in Armenia and southern part of Nagorno Karabakh republic // Материалы международной научной конференции “Биологическое разнообразие и

проблемы охраны фауны Кавказа”. Ереван, 2011. С. 291–292. [Stepanyan I., Schreiber R., Plotner J. On the systematic status of water frogs in Armenia and southern part of Nagorno Karabakh republic // Proceedings of the international conference “Biological diversity and conservation problems of the fauna of the Caucasus”. Yerevan, 2011. P. 291–292.]

**GENETIC CHARACTERISTICS OF MARSH FROG
(PELOPHYLAX RIDIBUNDUS COMPLEX) FROM THE WESTERN
CAUCASUS BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA DATA**

O. A. Ermakov¹, E. P. Simonov^{2,3}, A. Ju. Ivanov¹, R. I. Zamaletdinov⁴, A. I. Fayzulin⁵

¹*Penza State University*

440026 Penza, ul. Krasnaya, 40, e-mail: oaermakov@list.ru

²*Papanin Institute for Biology of Inland Water*

152742 Borok, Nekouzskii raion, Yaroslavskaya oblast, e-mail: ev.simonov@gmail.com

³*Tomsk State University*

634050 Tomsk, Lenina av., 36

⁴*Kazan Federal University*

420008 Kazan, ul. Kremlevskaya, 18, e-mail: i.ricinus@rambler.ru

⁵*Institute of Ecology of Volga Basin*

445003 Togliatti, Samarskaya oblast, ul. Komzina, 10, e-mail: amvolga@inbox.ru

Molecular genetic analysis of 73 specimen of *Pelophylax ridibundus* complex from 14 locations in Russia (Krasnodarskiy Krai, Republic of Adygea), Georgia and Armenia were conducted using COI and SAI-1 DNA markers. The mtDNA haplotype typical for “eastern” form of marsh frog (= Anatolian *P. cf. bedriagae*) is prevalent in west Caucasus, while haplotype peculiar to the “western” form (= Central European *P. ridibundus*) is fully absent. Two specimens carried a haplotype typical for “Euphrates” line were found in northern Armenia. Analysis of nuDNA nevertheless revealed remarkable presence of alleles belonging to the “western” form of marsh frog in the studied area. The mean ratio of “western” and “eastern” allele frequencies is close to 1:3.

Keywords: marsh frog, *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, cytochrome oxidase, serum albumin, Caucasus.