



**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РАН
ГЕРПЕТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО им. А.М. НИКОЛЬСКОГО**

**Современная герпетология:
проблемы и пути их решения**

**Первая международная молодежная конференция
герпетологов России и сопредельных стран**

**Санкт-Петербург, Россия
25–27 ноября 2013 г.**

СБОРНИК СТАТЕЙ

Санкт-Петербург
2013

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗЁРНЫХ ЛЯГУШЕК (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*)
ИЗ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ**

М.М. Закс, Н.В. Быстракова, О.А. Ермаков, С.В. Титов
Пензенский государственный университет, Пенза, Россия
zaks.pnz@gmail.com

**MOLECULAR GENETIC AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF MARSH FROGS (*PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*) FROM THE PENZA REGION**

M.M. Zaks, N.V. Bystrakova, O.A. Ermakov, S.V. Titov
Penza State University, Penza, Russia

Исследования последнего десятилетия показали, что под названием озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) скрываются несколько морфологически сходных видов. На территории нашей страны они изучены недостаточно, но по ряду различий среди них были выделены две формы – «западная» и «восточная» (Боркин и др., 2004). Молекулярно-генетические данные об обитании этих форм на территории России до настоящего времени ограничивались одной работой (Plötner et al., 2010), в которой показано, что «восточная» форма («*P. cf. bedriagae*»), за исключением случаев непреднамеренной интродукции, распространена до линии Волгоград–Уральск–Орск, а северо-западнее обитает «западная» форма (*P. ridibundus*).

На территории Пензенской области нами были обнаружены межпопуляционные отличия озерных лягушек по морфологическим и биоакустическим признакам (Закс, 2012; Ермаков и Закс, 2012), что позволило предположить обитание здесь двух разных форм этого вида. Предлагаемое сообщение посвящено молекулярно-генетической диагностике этих форм по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК (далее – мт- и яДНК) и поиску морфологических различий между ними.

Всего проанализированы 100 экз. озерной лягушки из 15 географических пунктов Пензенской области.

Молекулярно-генетический анализ. В качестве образцов тканей для выделения ДНК использовалась часть пальца передней конечности амфибий, взятая прижизненно и зафиксированная в 96% этаноле. ДНК выделяли по стандартной методике, включающей обработку додецилсульфатом натрия (SDS) и протеиназой К при 50°C с последующими фенольно-хлороформной очисткой и осаждением охлажденным абсолютным этиловым спиртом в сильно солевой среде (Sambrook et al., 1989).

Использовали 2 молекулярно-генетических маркера: для мтДНК – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы (COI, «DNA barcoding»), для яДНК – интрон 1 гена сывороточного альбумина (SAI-1) (Plötner et al., 2009). В первом случае при помощи универсальных праймеров (Ivanova et al., 2007) 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., в печати). Во втором случае, использовались праймеры из вышеуказанной работы (Plötner et al., 2009), а видоспецифичные замены для рестрикционной диагностики форм определялись по первичной структуре интрона 1 гена SA экземпляров *P. ridibundus* и *P. cf. bedriagae* (Plötner et al., 2012) из базы данных GenBank NCBI.

PCR-реакцию проводили в стандартной реакционной смеси в течение 30 циклов в обобщенном режиме: 94° С – 1 мин, 60° С – 1 мин, 72° С – 1 мин. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) на базе лаборатории молекулярной экологии и систематики животных Пензенского государственного

университета. PCR-фрагменты гидролизовали рестрикционными эндонуклеазами: *RsaI* (сайт GTAC) для гена COI 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.

Морфологический анализ. Измерялись следующие морфологические параметры: длина тела (L), длина головы (Lc), расстояние между глазами (Spoc), длина глаза (Lo), ширина головы (Ltc), длина бедра (F), длина голени (T), длина первого пальца задней конечности (Dp), длина внутреннего пяточного бугра (Ci), длина плюсны (дополнительной голени) (Cs) (Таращук, 1989). Полученные данные использовались для расчета относительных показателей – индексов пропорциональности: L/Ltc, L/T, L/Ci, Dp/Ci, T/Ci, Ltc/Ci, L/Lc, L/Spoc, L/F, L/Dp, L/Cs, F/T, которые обрабатывались статистическими методами (дискриминантный и кластерный анализ) в программе Statistica 6.0.

Общие генетические характеристики изученной выборки представлены в таблице 1. Выявлено, что в ее составе встречаются особи озерной лягушки как с гаплотипами «западной», так и «восточной» форм, а также экземпляры гибридного происхождения. К последним мы относили всех особей гетерозиготных по маркеру яДНК, а также экземпляры, совмещающие в своем генотипе маркеры разных видов.

При всех типах скрещиваний двух форм (гибриды первого, второго поколения, возвратные скрещивания и беккроссы) теоретически возможны шесть комбинаций генетических маркеров. Поскольку в исследованной выборке обнаружены все их возможные комбинации, можно предполагать, что процесс гибридизации происходил в течение нескольких лет, т.к. появление всех ожидаемых вариантов наиболее вероятно при скрещивании беккроссов между собой. Расчет ожидаемых частот встречаемости гибридов по уравнению Харди-Вайнберга для свободного скрещивания показал, что фактическое число гибридов не противоречит ожидаемому значению ($\chi^2=3.29, p=0.19$). Суммарная доля «чистых» особей с комбинацией маркеров *RR* или *BB* довольно низка на фоне большого количества гибридных сочетаний (22% против 78%), при этом и «чистые» особи могут быть результатом выщепления при скрещивании гибридных форм. Кроме того, нами показано расхождение данных, полученных при изучении мт- и яДНК. Если результаты анализа маркера мтДНК показали преобладание у изученных экземпляров митотипов «восточной» формы, то исследования маркера яДНК, напротив – преобладание гаплотипов «западной» формы (Табл. 1).

Таблица 1

Общие генетические характеристики озерных лягушек (n=100) из Пензенской области					
мтДНК – ген COI					
R 28%			B 72%		
яДНК – ген SA интрон 1					
R (RR) 73%		H (RB) 22%		B (BB) 5%	
Комбинация маркеров яДНК и мтДНК					
RR 19%	RB 54%	HR 7%	HB 15%	BB 3%	BR 2%

Примечание: R – аллели *P. ridibundus*, B – аллели *P. cf. bedriagae*, H – гетерозигота.

В дальнейшем был проведен статистический анализ морфологических признаков всех шести групп с различными комбинациями генетических маркеров. По результатам дискриминантного анализа видно: во-первых, значительное перекрытие эллипсов сравниваемых групп, во-вторых, эллипсы «чистых» экземпляров расположены практически полностью внутри зоны изменчивости «гибридов» в целом (Рис. 1А). Первая дискриминантная функция (DF1) описывает 68% общей дисперсии и показывает отно-

сительное увеличение размеров головы и отделов задней конечности. Данные кластерного анализа (Рис. 1Б) по координатам центроидов (DF1, DF2) объединяют гетерозиготных особей с различными типами мтДНК (*HB* и *HR*) с дистанцией 0,47, а также особей с гаплотипом яДНК «западной» формы (*RR* и *RB*) – дистанция 0,30. Евклидовы дистанции между ними и экземплярами с гаплотипами яДНК «восточной» формы (*BB* и *BR*) значительно больше – 0,74 и 1,71, соответственно. Однако небольшой объем выборки «чистых» особей и указанная выше возможность их гибридного происхождения за счет возвратных скрещиваний и беккроссов не позволяют нам делать выводы о наличии достоверных морфологических различий между «восточной» и «западной» формами озерных лягушек.

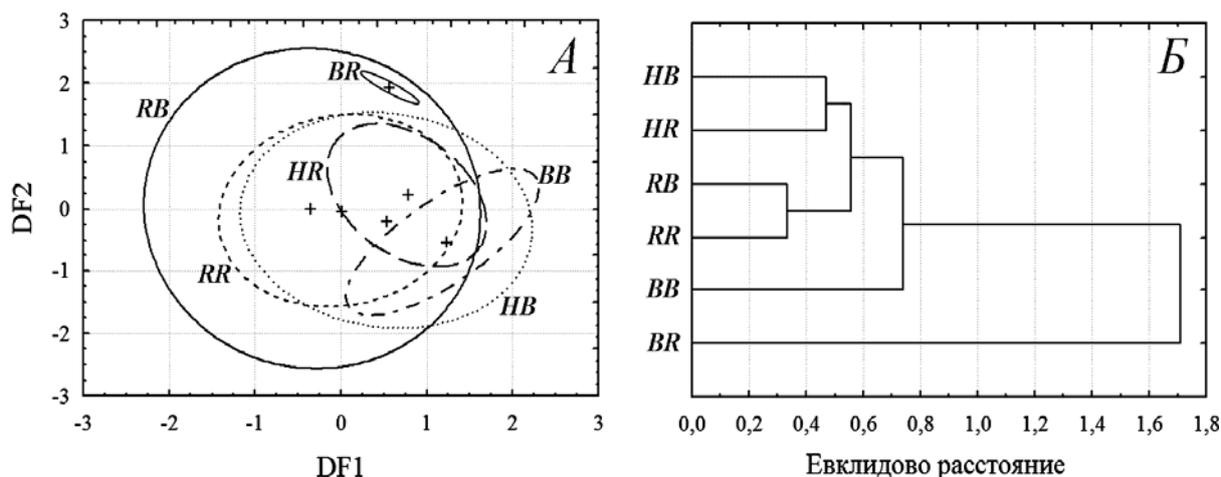


Рис. 1. Результаты дискриминантного анализа (А) и кластеризации координат центроидов эллипсов рассеивания (Б), характеризующие морфологические параметры генетически типированных озерных лягушек из Пензенской области (обозначения групп см. в Табл. 1)

Таким образом, результаты исследования позволили выявить на территории Пензенской области зону симпатрии двух генетически дифференцированных форм озерной лягушки, ранее известную лишь в Юго-восточной Европе и Прикаспии (Hotz et al., 2013). Данные по частотам генетических маркеров позволяют предполагать на изученной территории широкий процесс гибридизации, начало которого отследить по одномоментному временному срезу довольно трудно, и вероятное отсутствие отбора против гибридов. Для поиска морфологических различий между «западной» и «восточной» формами озерной лягушки необходим анализ выборок из «чистых» поселений расположенных вне зоны симпатрии.

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

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. № 8. С. 936–960.
2. Боркин Л.Я. Класс Амфибии, или Земноводные – Amphibia / Ананьева Н.Б., Боркин Л. Я., Даревский И.С., Орлов И.Л. Земноводные и пресмыкающиеся. М.: АВФ, 1998. С. 19–174.
3. Ермаков О.А., Закс М.М., Тутов 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. Серия: естественные и технические науки. № 6. (в печати).

4. Закс М.М. К вопросу о морфологических различиях популяций озерной лягушки (*Pelophylax (Rana) ridibundus*) Пензенской области // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского, 2012. № 29. С. 209–212.
5. Закс М.М., Ермаков О.А. Межпопуляционная изменчивость звукового сигнала озерной лягушки *Pelophylax (Rana) ridibundus* в Среднем Поволжье // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского, 2012. № 29. С. 213–215.
6. Таращук С.В. Схема морфометрической обработки представителей семейства настоящих лягушек // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся, 1989. С. 73–74.
7. Hotz H., Beerli P., Uzzell T., Guex G.D., Pruvost N.B., Schreiber R., Plötner J. Balancing a cline by influx of migrants: a genetic transition in water frogs of eastern Greece // J. Hered., 2013. V. 104(1). P. 57–71.
8. Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H., Hebert P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding // Molecular Ecology Notes, 2007. V. 7(4). P. 544–548.
9. 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.
10. Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Guex G-D., Litvinchuk S.N., Westaway R., Reyer H-U., Pruvost N., Hotz H. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in eastern mediterranean water frogs / M. Glaubrecht (ed.), Evolution in Action. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. P. 373–403.
11. 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. EV., 2012. V. 88(2). P. 261–283.
12. 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.