



Российские исследования Гималаев и Тибета - 2024



ПРИРОДА И КУЛЬТУРА



Генетическая дифференциация жаб рода *Duttaphrynus* (Bufonidae) в Западных Гималаях, Уттаракханд, Индия (предварительные данные)

А.О. Свинин¹, В.Л. Вершинин^{2, 3}, П.К. Иброгимова⁴ и Л.Я. Боркин⁵

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия; ranaesc@gmail.com

² Институт экологии растений и животных Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия; vol_de_mar@list.ru

³ Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия; Vladimir.Vershinin@urfu.ru

⁴ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия; p.k.ibrogimova@utmn.ru

⁵ Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия; Leo.Borkin@zin.ru

Genetic differentiation of the toad genus *Duttaphrynus* (Bufonidae) in the Western Himalaya, Uttarakhand, India (preliminary data)

A.O. Svinin¹, V.L. Vershinin^{2, 3}, P.K. Ibrogimova⁴, and L.J. Borkin⁵

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia; ranaesc@gmail.com

² Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia; vol_de_mar@list.ru

³ Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia; Vladimir.Vershinin@urfu.ru

⁴ Tyumen State University, Tyumen, Russia; p.k.ibrogimova@utmn.ru

⁵ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia; Leo.Borkin@zin.ru

Род *Duttaphrynus* Grant, Faivovich, Bain, Haas, Haddad, de Sá, Channing, Wilkinson, Donnellan, Raxworthy, Cambell, Blotto, Moler, Drewes, Nussbaum, Lynch, Green et Wheeler, 2006 был выделен из считавшегося ранее космополитичным рода *Bufo* (Frost et al., 2006). Он был назван в честь известного современного индийского герпетолога Сушила Дутты (Sushil Kumar Dutta) и в настоящее время объединяет 23 вида жаб, обитающих в Ориентальном (или Индо-Малайском) царстве от Пакистана до Индонезии (Frost, 2024). Типовым видом рода при его описании была обозначена чернорубцовая жаба, *Bufo melanostictus* Schneider, 1799 (Frost et al., 2006).

В Западных Гималаях обитает два вида рода *Duttaphrynus*, высотное распределение которых различно (Литвинчук и др., 2017). Среди них гималайская жаба, *Duttaphrynus himalayanus* (Günther, 1864) самая высокогорная (1065–2730 м над уровнем моря), тогда как чернорубцовая жаба обитает ниже (300–1830 м). Ранее в этот род включали также и южноазиатскую жабу, *Duttaphrynus stomaticus*, которую недавно было предложено относить к *Firouzophrynus Safaei-Mahroo et Ghaffari*, 2020. Её нередко путали с зелёными жабами (ныне род *Bufotes Rafinesque*, 1815). *Firouzophrynus stomaticus* (Lütken, 1864), как и два упомянутых вида, также обитает в Западных Гималаях на высотах 245–2060 м (Литвинчук и др., 2017). Ареалы всех трёх видов перекрываются, в том числе и по вертикали.

Если определение видовой принадлежности взрослых особей этих жаб обычно не вызывает проблем, то отнесение головастиков в природе к тому или иному виду затруднительно, и в таком случае на помощь могут прийти молекулярные методы.

Нами были изучены жабы рода *Duttaphrynus*, преимущественно головастики, из Гархвала, административного района, занимающего западную часть индийского штата Уттаракханд (Garhwal, Uttarakhand), бассейн реки Ганг. Сборы были сделаны в ходе 5-й и 7-й западно-гималайских экспедиций в Гархвал, организованных Центром гималайских научных исследований Санкт-Петербургского союза учёных в апреле–мае 2019 и в мае 2023 годов (Боркин и др., 2021; Vershinin et al., 2023; Боркин, 2024), а также в ходе поездки другой группы в августе–сентябре 2023 года.

Для предварительного молекулярно-генетического анализа было отобрано 13 особей из четырёх пунктов Гархвала.

1. Озеро Деория (Deoria Tal, 2438 м, Rudraprayag District), 14 мая 2023, 1 экземпляр мёртвой взрослой жабы, найденной в мумифицированном состоянии (почти скелет) на берегу озера; был определён в поле как *Duttaphrynus himalayanus* (см. Боркин, 2024: 86, фото озера).

2. Селение Сари (Sari, Rudraprayag District), 7 экземпляров: 1 экземпляр полу-взрослой раздавленной жабы, найденный на дороге (2024 м, 14 мая 2023), и 6 головастиков, пойманных в стоке из водопада в Сари (1976 м, 27 августа 2023). Данный пункт находится рядом с № 1, отсюда начинается подъём к озеру Деория.

3. Река Бхагиратхи (Bhagirathi River, 1203 м, недалеко от придорожного отеля “The Great Ganga”, Uttarkashi District), 5 мая 2019, 4 головастика; они были предварительно определены в поле как *Duttaphrynus himalayanus* (см. Vershinin et al., 2023: 30–31, “Site 6: Bhagirathi-1”, Fig. 8, фото).

4. Пункт без этикетки. Нами был изучен ещё один головастик из сборов Первой Гархвальской экспедиции СПбСУ 2019 года, скорее всего, происходящий из пунктов № 3–5 или № 7; предварительно головастики оттуда были отнесены к *Duttaphrynus himalayanus* (см. Vershinin et al., 2023). К сожалению, точная этикетка утеряна.

Таким образом, в анализ попали преимущественно головастики (n = 11), трудно поддающиеся идентификации по внешним признакам. В качестве образ-

пов для выделения ДНК использовались первые фаланги четвёртого пальца у жаб и фрагменты хвостового плавника у головастика.

Выделение ДНК проведено с использованием набора DU-250 BioLabMix (Новосибирск, Россия). Полученная ДНК использовалась для амплификации локуса первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (COI) с применением вырожденных праймеров VUTF 5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-TCT-CAA-CCA-AYC-AYA-ARG-AYA-TYG-G-3' и VUTR 5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACT-ARA-CTT-CTG-GRT-GKC-CRA-ARA-AYC-A-3' (Ivanova et al., 2007).

Амплификация проведена в объёме 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл ДНК, 15 пмоль каждого праймера, 0.25 мМ каждого dNTP, 2 мМ MgCl₂, 10x ПЦР-буфер (0.01 М Трис-НСl, 0.05 М KCl и 0.1% Тритон X-100; pH 9.0) и 0.2 ед./мкл Taq-полимеразы. Условия амплификации включали начальную денатурацию при 94°C в течение 4 минут, за которой следовали 30 циклов: 30-секундная денатурация при 94°C, 35-секундный отжиг при 50°C и 50-секундная элонгация при 72°C. Программа термоциклирования завершалась заключительным этапом элонгации при 72°C в течение 5 минут. Продукты амплификации очищались с использованием стандартного набора для очистки ДНК из геля MagPure Gel Pure DNA Kit (Guangzhou Magen Biotechnology, Китай).

Секвенирование по Сэнгеру проводилось на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием стандартных наборов BigDye® Terminator 3.1 (Applied Biosystems) и тех же праймеров, применяемых при амплификации. Полученные последовательности выравнялись вручную с использованием программы Chromas v. 2.5.1 (Technelysium Ltd., Австралия). Процедура идентификации последовательностей проводилась с использованием алгоритма BLAST в сравнении с известными нуклеотидными последовательностями из базы данных GenBank NCBI.

Для построения филогенетических взаимоотношений внутри рода использовались программы MEGAX (Kumar et al., 2018) и IQ-TREE (Nguyen et al., 2015). Оптимальные эволюционные модели были определены с помощью MODELTEST v. 3.06 (Posada & Crandall, 1998) на основе информационного критерия Акаике (AIC). Для первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (COI) чернорубцовых жаб модель HKY+G+I была признана наилучшей. Поддержка ветвей была рассчитана на основе 1000 итераций бутстрэпа. Средние генетические расстояния (*p*-расстоянии) рассчитаны в MEGAX.

Наши данные подтверждают предварительно определённую видовую принадлежность выборок жаб и головастика, сделанную в полевых условиях: пункты 1 (Деория), 3 (Бхагиратхи) и 4. Особенно любопытны данные 2023 года (пункт 2, Сари). Выяснилось, что практически в одном географическом месте, но на разных высотах обитают разные виды: внизу *Duttaphrynus melanostictus* (Сари, 1976–2024 м), а выше над этим селением *Duttaphrynus himalayanus* (Деория, 2438 м). Кстати, находки в Сари повысили известный ранее верхний предел распространения чернорубцовой жабы в Западных Гималаях почти на 200 м, от 1830 м (Литвинчук и др., 2017) до 1976–2024 м.

Сопоставление наших данных с таковыми в Генбанке (GenBank NCBI) показало неоднородность *Duttaphrynus melanostictus*, которая образует на филогенетическом древе четыре хорошо поддер-

жанные клады, соответствующие видовому статусу (так называемые кандидаты в виды, *candidate species*). Наиболее близкими к изученным нами оказались последовательности из Уттаракханда, что неудивительно (KY000470–KY000473, KY000469; Bahuguna et al., неопубл.). Три другие клады образованы жабами с островов Тайвань (MH034182–MH034188) и Хайнань на юге Китая (JN700876). На основе митохондриального (ND3) и двух ядерных генов (*POMC* и *SOX9*) были выявлены три генетических линии *Duttaphrynus melanostictus*: прибрежная в Мьянме (= Бирма), внутренняя материковая (Юго-Восточная Азия) и островная (Зондские острова, Индонезия), вероятно, представляющие собой самостоятельные виды (Wogan et al., 2016).

В настоящее время сформировалось мнение, что *Duttaphrynus melanostictus* — это сложный надвидовой комплекс, в котором можно чётко различать две главные группы популяций видового уровня: западную и восточную, объём и ареалы которых различаются при анализе ядерных или митохондриальных генов. Более того, картина распространения осложняется многочисленными интродукциями и гибридизацией. Ареал западной группы (собственно *Duttaphrynus melanostictus sensu stricto*) охватывает Южную Азию, включая Западные Гималаи (Akram et al., 2021; Jablonski et al., 2022; Dufresnes et al., in press).

Выборки *Duttaphrynus himalayanus* по использованному нами локусу занимают обособленную хорошо поддержанную кладу, соответствующую видовому статусу. Они наиболее близки к другим выборкам гималайской жабы, ранее полученным из Уттаракханда (KY000464–KY000468).

Генетические дистанции между популяциями чернорубцовых жаб из Уттаракханда ($n = 12$, наши данные и из GenBank) составили 0.009–0.011. Показатель нуклеотидного разнообразия (P) был равен 0.006. Показатель разнообразия гаплотипов (H_d) по *COI* для линии *Duttaphrynus melanostictus* достигал значения 0.621 ± 0.014 . Обнаружено всего восемь полиморфных сайтов для фрагментов в 548 пар оснований, включённых в анализ. Индекс Таджимы (Tajima's D) был равен 1.16.

Анализ генетического полиморфизма гималайских жаб ($n = 11$, наши данные и из GenBank) выявил более низкий полиморфизм по сравнению с чернорубцовой жабой. Показатель нуклеотидного разнообразия (P) составил 0.003. Однако показатель разнообразия гаплотипов (H_d) по *COI* у *D. himalayanus* был несколько выше (0.691 ± 0.007). Во фрагментах длиной 548 н.п. найдено всего четыре полиморфных сайта. Индекс Таджимы был равен 0.36.

Таким образом, генетический полиморфизм у двух видов жаб рода *Duttaphrynus* в Гархвальских Гималаях оказался различным. Чернорубцовая жаба проявляет гораздо более высокий уровень полиморфизма по сравнению с гималайской, что выражается в количестве полиморфных сайтов, нуклеотидном разнообразии, а также в количестве гаплотипов (4 против 3) на идентичные фрагменты последовательностей гена цитохром-с-оксидазы.

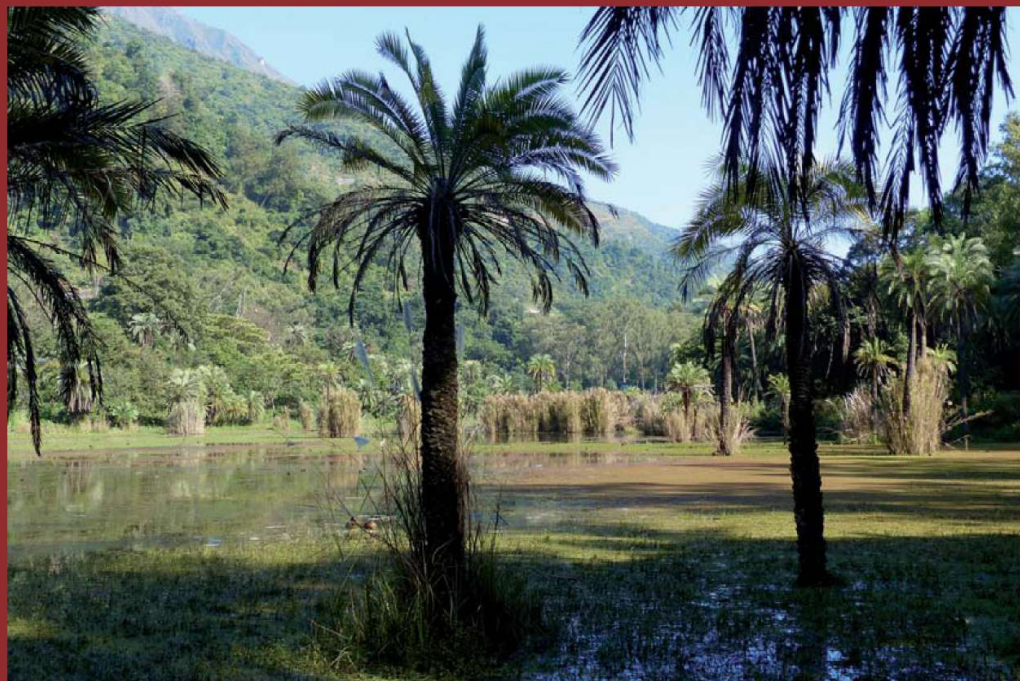
Благодарности. Мы благодарны Центру гималайских научных исследований Санкт-Петербургского союза учёных за организацию комплексных экспедиций в Гархвал в апреле–мае 2019 и в мае 2023 годов, а их участникам (С.Д. Вершинина, М.В. Винарский, О.А. Ганцелевич, Н.И. Неупокоева) за помощь в работе. М.В. Винарский, вторично посетивший Гархвал в составе группы в августе–сентябре 2023 года, передал нам серию головастика из Сари. Исследование выполнено в рамках темы ЗИН РАН № 122031100282–2 (Л.Б.).

Литература

- Боркин Л.Я.** 2024. Вторая Гархвальская экспедиция Санкт-Петербургского союза учёных (Западные Гималаи, Уттаракханд, Индия, май 2023 г.). — *Биота и среда природных территорий*, Владивосток, т. 12, № 1, с. 78–95. https://doi.org/10.25221/2782-1978_2024_1_5
- Боркин Л.Я., Андреев А.В., Вершинин В.Л., Вершинина С.Д., Винарский М.В., Лопатина Е.Б. и Неупокоева Н.И.** 2021. Комплексная экспедиция Санкт-Петербургского союза учёных в Гархвальские Гималаи, Индия (2019): некоторые предварительные итоги. — *Биота и среда природных территорий*, Владивосток, № 1, с. 106–145. doi: 10.37102/2782-1978_2021_1_8
- Литвинчук С.Н., Боркин Л.Я., Мазепа Г., Скоринов Д.В., Мельников Д.А. и Розанов Ю.М.** 2017. Особенности распространения амфибий в Западных Гималаях (Индия). — В кн.: Боркин Л.Я. (ред.). *Российские гималайские исследования: вчера, сегодня, завтра*. Санкт-Петербург: «Европейский Дом», с. 188–194.
- Akram A., Rais M., Lopez-Hervas K., Tarvin R.D., Saeed M., Bolnick D.I. & Cannatella D.C.** 2021. An insight into molecular taxonomy of bufonids, microhylids, and dicroglossid frogs: first genetic records from Pakistan. — *Ecology and Evolution*, vol. 11, n. 20, p. 14175–14216. doi: 10.1002/ece3.8134
- Dufresnes C., Jablonski D., Ambu J., Prasad V.K., Gautam K.B., Kamei R.G., Mahony S., Hofmann S., Masroor R., Alard B., Crottini A., Edmonds D., Ohler A., Jiang J., Khatiwada J.R., Gupta S.K., Borzée A., Borkin L.J., Skorinov D.V., Melnikov D.A., Milto K.D., Konstantinov E.L., Künzel S., Suchan T., Arkhipov D.V., Trofimets A.V., Nguyen T.V., Suwannapoom C., Litvinchuk S.N. & Poyarkov N.A.** Speciation and historical invasions of the Asian black-spined toad (*Duttaphrynus melanostictus*). (In press).
- Frost D.R.** 2024. *Amphibian Species of the World: an online reference*. Version 6.2. Electronic database. New York (USA): American Museum of Natural History, <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php> (Date of access:

- 30.10.2024).
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B., de Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy C.J., Cambell J.A., Blotto B.L., Moler P., Drewes R.C., Nussbaum R.A., Lynch J.D., Green D.M. & Wheeler W.C. 2006.** The amphibian tree of life. — *Bulletin of the American Museum of Natural History*, New York, n. 297, p. 1–370. B297.pdf
- Ivanova N.V., Zemlak T.S., Hanner R.H. & Hebert P.D.N. 2007.** Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. — *Molecular Ecology Notes*, vol. 7, n. 4, p. 544–548.
- Jablonski D., Masroor R. & Hofmann S. 2022.** On the edge of the Shivaliks: an insight into the origin and taxonomic position of Pakistani toads from the *Duttaphrynus melanostictus* complex (Amphibia, Bufonidae). — *Zoosystematics and Evolution*, Sofia (Bulgaria), vol. 98, n. 2, p. 275–284. doi:10.3897/zse.98.79213
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. — *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, n. 6, p. 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
- Nguyen L.-T., Schmidt H.A., Von Haeseler A. & Minh B.Q. 2015.** IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. — *Molecular Biology and Evolution*, vol. 32, n. 1, p. 268–274. doi:10.1093/molbev/msu300
- Posada D. & Crandall K.A. 1998.** MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. — *Bioinformatics*, vol. 14, n. 9, p. 817–818. doi:10.1093/bioinformatics/14.9.817
- Vershinin V.L., Vershinina S.D. & Borkin L.J. 2023.** Mass occurrence of tadpole deformities in toad species of the genus *Duttaphrynus* (Bufonidae) in the Himalaya (Uttarakhand, India). — *Russian Journal of Herpetology*, Moscow, vol. 30, n. 1, p. 27–48. <https://doi.org/10.30906/1026-2296-2023-30-1-27-48>
- Wogan G.O.U., Stuart B.L., Iskandar D.T. & McGuire J.A. 2016.** Deep genetic structure and ecological divergence in a widespread human commensal toad. — *Biology Letters*, London, vol. 12, n. 1, article 20150807, p. 1–5. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0807>





978 5 8015 0437 7



Европейский Дом