

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ
PELOPHYLAX RIDIBUNDUS (AMPHIBIA, ANURA, RANIDAE)
ЮЖНОЙ ЧАСТИ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ЯДЕРНОЙ ДНК**

А. И. Файзулин¹, О. В. Кукушкин^{2,3}, А. Ю. Иванов⁴, О. А. Ермаков⁴

¹Институт экологии Волжского бассейна РАН
Россия, 445003, Тольятти, Комзина, 10
E-mail: alexandr-faizulin@yandex.ru

²Карадагская научная станция им. Т. И. Вяземского – природный заповедник РАН
Россия, 298188, Феодосия, пос. Курортное, Науки, 24

³Зоологический институт РАН
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 1

⁴Пензенский государственный университет
Россия, 440026, Пенза, Красная, 40

Поступила в редакцию 19.03.2017 г.

Проведен молекулярно-генетический анализ 28 особей озёрной лягушки *Pelophylax ridibundus* complex из 12 пунктов Крымского полуострова по двум молекулярным маркерам – гену первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) мтДНК и первому интрону гена сывороточного альбумина (*SAL-1*) яДНК. Установлено, что у обитающих в Крыму озёрных лягушек преобладает тип мтДНК, специфичный для «восточной» формы (=анатолийская *P. cf. bedriagae*), тогда как тип мтДНК, характерный для «западной» (=центрально-европейская *P. ridibundus*), отмечен единично в бассейне р. Чёрная (юго-западный Крым). В то же время анализ ядерного маркера показал присутствие в изученном регионе аллелей «западной» формы озёрной лягушки, которые встречаются здесь реже «восточной» (соотношение частот – 2:5). Аллели «западной» формы выявлены в контрастных ландшафтных зонах и различных высотно-климатических поясах полуострова, что может свидетельствовать о существовании разнонаправленных колонизационных волн *P. ridibundus* в плейстоцен-голоценовую эпоху.

Ключевые слова: *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, цитохромоксидаза, сывороточный альбумин, бассейн р. Чёрная, Крым.

DOI: 10.18500/1814-6090-2017-17-1-2-56-65

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на основе молекулярно-генетических данных озёрная лягушка *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) рассматривается как комплекс видов (Боркин и др., 2004; Plötner, 2005; Plötner et al., 2008, 2012). В Причерноморье, в частности, на территории Большого Кавказа, Турции и в сопредельных регионах, по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК (далее мт- и яДНК), отмечено обитание двух генетически дифференцированных форм озёрной лягушки – «западной» (=центрально-европейская *P. ridibundus*) и «восточной» (=анатолийская *P. cf. bedriagae*) (Ермаков и др., 2016 а, б; Akin et al., 2010; Plötner et al., 2010, 2012).

В Крыму озёрная лягушка распространена практически повсеместно в водоёмах низменной, предгорной и горной частей полуострова в диапазоне высот от 0 до 1150 м над у.м. (Щербак, 1966; Писанец, Кукушкин, 2016). Систематическое положение и родственные связи обитающих в Кры-

му озёрных лягушек оценивались с использованием морфометрических (Щербак, 1966; Сурядная, 2002) и кариологических (Сурядная, 2003; Манило, 2005) методик, по размеру генома (Литвинчук и др., 2008), а также с применением методов молекулярно-генетического анализа (Akin et al., 2010; Plötner et al., 2010). В частности, изучение морфометрических параметров озёрных лягушек Крыма, Кавказа и Молдавии позволило прийти к заключению о том, что «... крымская популяция в прошлом имела более тесные связи с популяциями территорий, расположенных восточнее, либо о большей близости физико-географических условий местностей, где собирался коллекционный материал» (Щербак, 1966, с. 56). Таким образом, крымская популяция оказалась наиболее близкой к популяциям, населяющим Кавказский перешеек. Однако степень различий озёрных лягушек из этих смежных регионов при этом все же достаточно высока, что «... свидетельствует о древней изоляции Крыма» (Щербак, 1966, с. 57).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ

Позднее для озёрной лягушки Крыма был установлен определенный уровень географической изменчивости, проявляющейся в морфологических отличиях горных и равнинных популяций (Сурядная, 2002; Писанец, Кукушкин, 2016). В то же время хромосомный анализ не выявил различий между крымскими и ближайшими континентальными популяциями (Сурядная, 2003). По данным С. Н. Литвинчука с соавторами (2008), озёрные лягушки Крыма, юга Украины, Западного Кавказа, Поволжья и бассейна р. Урал формируют общность, занимающую промежуточное положение между группами с большим (16.22 – 16.70 пг) (Закавказье, горный Дагестан, юго-восточный Казахстан и Кыргызстан) и меньшим (15.51 – 16.35 пг) количеством яДНК (Балканский полуостров, Молдова, запад и север Украины, Белоруссия, Прибалтика, европейская часть России западнее Поволжского региона). По результатам анализа мтДНК в Крыму выявлены исключительно представители анатolianской линии *P. cf. bedriagae*, представляющей собой таксон, по-видимому, видового ранга, обособление которого датируется рубежом миоцена и плиоцена, в то время как на равнинных территориях севернее Крыма, включая нижнее течение Днепра, известна только цен-

трально-европейская линия (Plötner et al., 2010; Akin et al., 2010, 2014).

В задачи настоящего исследования входило изучение распределения маркеров мт- и яДНК «восточной» и «западной» форм в популяциях озёрных лягушек, обитающих в южной части Крымского полуострова.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала производился в 2014 – 2016 гг. Исследовано 28 особей из 12 географических пунктов, расположенных на территории Крыма. Сборами охвачены все основные ландшафтные пояса и высотные ярусы Крыма (Позаченюк, 2015), однако в общей выборке численно преобладали (86%) особи из горной части полуострова (табл. 1).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК методом высаливания (Aljanabi, Martinez, 1997) брали первые фаланги пальцев задних конечностей, фиксированные в 96%-ном этаноле. Использовались 2 молекулярно-генетических маркера: для мтДНК – фрагмент первой субъединицы гена цитохромоксидазы (*COI*), для яДНК – интрон 1 гена сывороточного альбумина (*SAL-1*). Принадлежность гаплотипов мтДНК и аллелей

Таблица 1

Пункты, годы сбора и объем исследованного материала *Pelophylax ridibundus* (южная часть Крыма)

№	Локалитет: географическая привязка*	Год	n	Координаты		Высота н.у.м., м	Биотоп
				с.ш.	в.д.		
1	«Джага-Куци»: с. Охотниково, оз. Сасык-Сиваш, Сакский район	2014	3	45°14'	33°35'	< 1	Прибрежная часть крупного озера в равнинно-степной части
2	«Мангуш»: 1.5 км к С-З от с. Прохладное, подножье горы Каменная, Бахчисарайский район	2015	3	44°46'	33°59'	306	Крупный пруд в лесостепном предгорье
3	«Ильки-Чокрак»: 4 км к Ю-В от с. Ходжа-Сала, Адым-Чокракская долина, источник Ильки-Чокрак, Бахчисарайский район	2016	3	44°35'	33°50'	372	Источник в лесостепном предгорье
4	«Кучук-Мускомия»: 0.7 км к С от с. Резервное, Варнутская долина, г. Севастополь, Балаклавский район	2015	1	44°29'	33°41'	260	Крупный пруд в юго-западной лесостепной части Главной гряды
5	«Байдар»: 1 км к Ю-В от с. Орлиное, Байдарская долина, ущелье Деймень-Дере, р. Ташкутер-Узень, г. Севастополь, Балаклавский район	2015	1	44°26'	33°48'	380	Малая горная река в западной лесистой части Главной гряды
6	«Казанлы»: 4 км к З от с. Пчелиное, плато Караби-Яйла, урочище Казанлы, Белогорский район	2014	1	44°57'	34°29'	680	Крупный пруд в яйлинской горно-луговой степи
7	«Байсу»: 5 км к Ю-З от с. Красноселовка, плато Караби-Яйла, исток р. Байсу, Белогорский район	2014	5	44°53'	34°36'	901	Исток горной реки в яйлинской горно-луговой степи
8	«Меганом»: 6 км к Ю-В от с. Архадерессе, балка Капсель-Бугас, полуостров Меганом, Судакский городской округ	2015	3	44°49'	35°06'	16	Мелководные озера в каменистой полупустыне
9	«Отуз»: 1 км к З от пос. Щебетовка, долина р. Лагым-Узень, Феодосийский городской округ	2015	2	44°57'	35°08'	102	Крупный пруд в юго-восточной лесостепной части Главной гряды
10	«Кизилташ»: 4 км к С-В от пос. Краснокаменка, ущелье Водяная балка, Судакский городской округ	2015	3	44°57'	35°07'	236	Крупное озеро в лесистой восточной части Главной гряды
11	«Карадаг»: пос. Биостанция, Карадагский природный заповедник, Феодосийский городской округ	2014	2	44°54'	35°12'	21	Малое часто пересыхающее озеро в селитебной зоне
12	«Хрони»: окрестности с. Осовины, источник Осовинский Фонтан, мыс Хрони, Керченский полуостров, Ленинский район	2015	1	45°26'	36°36'	7	Мелкое природное озеро в степи близ моря

Примечание. * – для краткого обозначения локалитетов взяты исторические названия близлежащего населенного пункта, либо современные географические топонимы.

яДНК к «западной» или «восточной» формам устанавливалась по методике, опубликованной нами ранее (Ермаков и др., 2013; Закс и др., 2013).

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 в выборке. Различия частот аллелей оценивались с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) для таблиц 2×2, в программе STATISTICA v.10 (StatSoft).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа маркера митохондриальной ДНК показали наличие у 96% исследованных экземпляров озёрных лягушек Крыма митотипов, специфичных только для «восточной» формы (табл. 2, рис. 1), что согласуется с данными о доминировании гаплотипов *P. cf. bedriagae* в Крыму, Анатолии и на Кавказе (Ермаков и др., 2016 а, б; Akin et al., 2010).

Таблица 2

Соотношение типов мт- и яДНК в выборках *Pelophylax ridibundus* Крыма, %

№	Локалитет	n	COI мтДНК		SAI-1 яДНК		
			B	R	BB	BR	RR
1	Джага-Кущи	3	3	–	2	1	–
2	Мангуш	3	3	–	3	–	–
3	Ильки-Чокрак	3	3	–	2	1	–
4	Кучук-Мускомия	1	1	–	1	–	–
5	Байдар	1	–	1	–	1	–
6	Казанлы	1	1	–	1	–	–
7	Байсу	5	5	–	1	3	1
8	Меганом	3	3	–	1	2	–
9	Отуз	2	2	–	2	–	–
10	Кизилташ	3	3	–	1	2	–
11	Карадаг	2	2	–	–	2	–
12	Хрони	1	1	–	–	–	1
Всего		28 (100)	27 (96)	1 (4)	14 (50)	12 (43)	2 (7)

Примечание. B – гаплотипы мтДНК и аллели яДНК «восточной» формы, R – гаплотипы мтДНК и аллели яДНК «западной» формы. Номера соответствуют таковым на рис. 1 и 2.

Единственный экземпляр (4%) имеющий гаплотип «западной» формы обнаружен в пункте, расположенном в зоне Главной гряды Крымских гор в юго-западной части полуострова (локалитет

№ 5 «Байдар», табл. 2, рис. 1). Ближайшие пункты находок лягушек с мтДНК *P. ridibundus* отмечены севернее (в приустьевой части р. Днепр и на юго-востоке Украины) и северо-восточнее Крыма (в Ставропольском крае, Калмыкии, Астраханской и Волгоградской областях) (Ермаков и др., 2013, 2014; Akin et al., 2010; Hoffman et al., 2015).

Результаты анализа маркера яДНК показали, что кроме аллелей гена *SAI*, характерного для «восточной» формы, у озёрных лягушек Крыма встречаются аллели, специфичные для «западной» формы, при соотношении их частот приблизительно равном 5:2. 50% изученных особей были гомозиготами (BB) и диагностировались как «восточная» форма, 43% – гетерозиготами (BR) и 7% – гомозиготами (RR) «западной» формы (см. табл. 2, рис. 1). Наблюдаемое соотношение гомо- и гетерозигот не противоречит ожидаемому согласно закону Харди – Вайнберга ($\chi^2 = 0.07$, $df = 1$, $p = 0.966$). В связи с преобладанием в общей выборке аллелей «восточной» формы вероятно, что оба гомозиготных экземпляра «западной» формы являются результатом выщепления при скрещиваниях гетерозигот.

Несмотря на чрезвычайно высокий уровень ландшафтно-биотопической дифференциации южной части Крыма (Атлас..., 2003) (рис. 2), нами не выявлено существенных различий по генетическому составу озёрных лягушек, обитающих на различных высотах и в разных типах водоёмов ($\chi^2 = 0.63$, $p = 0.540$ и $\chi^2 = 1.87$, $p = 0.357$ соответственно) (табл. 3). При этом единственная особь с мтДНК «западного» типа обнаружена в регулярно пересыхающей в межень малой горной реке на сравнительно небольшой абсолютной высоте (см. табл. 1).

Полученные данные позволяют предположить, что на исследованной территории Крыма нет «чистых» озёрных лягушек «западной» формы, так как все изученные экземпляры диагностировались либо как «восточная» форма, либо совмещали в своем генотипе маркеры *P. cf. bedriagae* и *P. ridibundus*. Так, «западный» тип мтДНК сочетается с гетерозиготным типом яДНК (локалитет № 5 «Байдар»; см. табл. 2, рис. 2, а) – генотип R-RB, а гомозиготы западного типа сочетаются с митохондриальной ДНК, специфичной только для «восточной» формы (локалитеты № 7 «Байсу»; см. табл. 2, рис. 2, б; и локалитет № 12 «Хрони»; см. табл. 2, рис. 2, в) – генотип B-RR.

Наблюдаемое в изученном регионе несоответствие частот распределения маркеров мт- и яДНК двух форм, а именно редкость гаплотипов мтДНК «западной» формы (4%) при значительной доле «западных» аллелей в ядерном геноме (29%),

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ

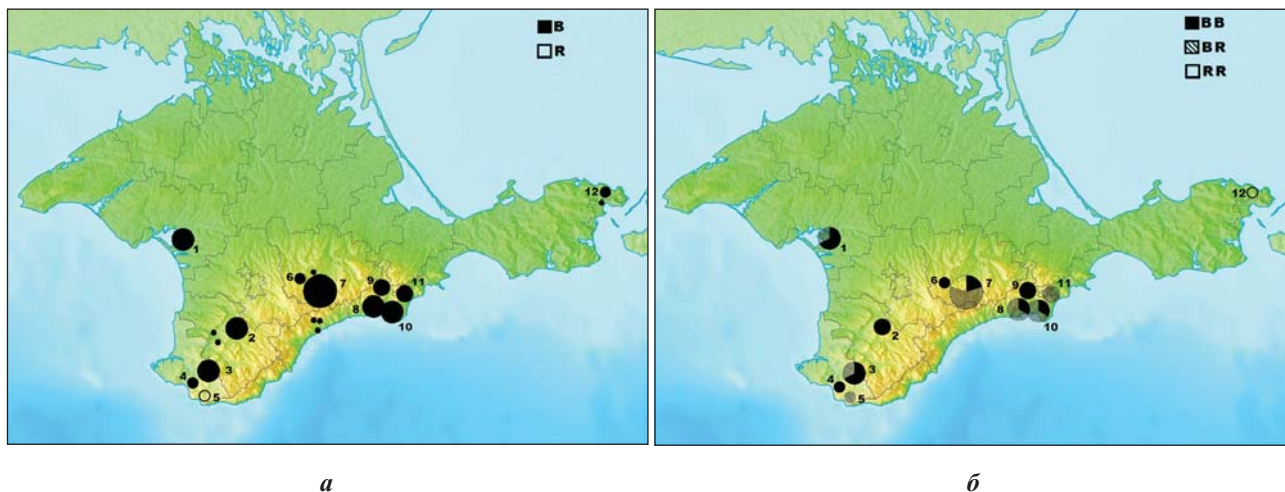


Рис. 1. Распределение гаплотипов мтДНК (а) и аллелей яДНК (б) в выборках *Pelophylax ridibundus* южной части Крыма. Номера точек соответствуют локалитетам в табл. 1 и 2, точки без нумерации – литературные данные (по: Akin et al., 2010). Размеры значков отражают объем изученных проб (от 1 до 5 экз.)



Рис. 2. Биотопы *Pelophylax ridibundus* в южной части Крымского полуострова: а – «Байдар», северный макросклон Главной горной гряды; б – «Байсу», Главная гряда, нагорье Караби-Яйла; в – «Меганом», Юго-Восточное побережье Крыма; г – «Хрони», Керченское степное холмогорье (фото О. В. Кукушкина)

Таблица 3

Соотношение типов мт- и яДНК в выборках крымских популяций *Pelophylax ridibundus* из различных типов биотопов

Тип биотопа	n	COI мтДНК		SAI-1 яДНК		
		B	R	BB	BR	RR
По высоте расположения над уровнем моря						
От 1 до 350 м н.у.м.	18 (64%)	18	0	10	7	1
От 350 до 901 м н.у.м.	10 (36%)	9	1	4	5	1
По характеру водоёма						
Стоячие (пруды, озёра)	19 (68%)	19	0	11	7	1
Проточные (малые горные реки, ручьи)	9 (32%)	8	1	3	5	1

Примечание. В – гаплотипы мтДНК и аллели яДНК «восточной» формы, R – гаплотипы мтДНК и аллели яДНК «западной» формы.

статистически поддержано ($\chi^2 = 7.23, p = 0.0082$). Подобное несоответствие частот генетических маркеров, возможно, отражает процессы заселения Крыма озёрной лягушкой. Так, по данным для северной и восточной Анатолии, наблюдаемое географическое распределение митохондриальных и ядерных маркеров у озёрных лягушек анатолийского (*P. cf. bedriagae*) и средневропейского (*P. ridibundus*) происхождения может быть следствием вторичного контакта данных форм в позднем плейстоцене – голоцене (Akin et al., 2014).

Ранее, на примере изучения распределения маркеров мт- и яДНК у озёрных лягушек Поволжья и Кавказа, нами показано, что на востоке Европейской равнины по направлению с юга на север доля маркеров «восточной» формы уменьшается, а «западной», напротив, – увеличивается (табл. 4). Частоты митохондриальных и ядерных маркеров озёрных лягушек Крыма в целом соответствуют этой тенденции и наиболее сходны с таковыми лягушек Кавказа. На обеих территориях доминируют гаплотипы и аллели, характерные для *P. cf. bedriagae*, различия по частотам маркеров мт- и яДНК недостоверны ($\chi^2 = 2.63, p = 0.2772$ и $\chi^2 = 1.02, p = 0.3691$ соответственно). Сравнение по тем же показателям Крыма с регионами, расположенными севернее и восточнее Кавказа, выявило статистически поддержанные различия: в

меньшей степени со Средним Поволжьем ($\chi^2 = 9.73, p = 0.0011$ и $\chi^2 = 7.53, p = 0.0106$) и в большей – с Верхним Поволжьем ($\chi^2 = 59.27$ и $\chi^2 = 111.00$, в обоих случаях $p < 0.0001$).

В свете полученных (пока предварительных) данных новое звучание получают неоднократно обсуждаемые в литературе вопросы: о гипотетическом влиянии Северо-Крымского канала на таксономический состав батрахофауны Крыма и об «автохтонности» популяций озёрной лягушки, населяющих южную часть Горного Крыма (Щербак, 1984; Котенко, 2005; Писанец, Кукушкин, 2016). С одной стороны, во всех ландшафтных зонах Крымского полуострова доминируют молекулярные маркеры «восточной» формы, которая отсутствует в Нижнем Поднепровье (Akin et al., 2010), до последнего времени связанном с Крымом крупнейшей ирригационной системой. Таким образом, предполагаемая массовая инвазия днепровской *P. ridibundus* s. s. на значительную часть территории Крыма с использованием Северо-Крымского канала на сегодняшний день не подтверждена. С другой стороны, митохондриальный гаплотип «западной» формы обнаружен только на крайнем юго-западе Горного Крыма в бассейне р. Чёрная – наиболее обособленной из значительных крымских рек, гидрофауна которой характеризуется обилием реликтов переднеазиатского и

Таблица 4

Соотношение «западных» (R) и «восточных» (B) гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК у *Pelophylax ridibundus* в изученных регионах, %

Регион	n	мтДНК		n	яДНК		Источник
		R	B		R	B	
Крым	28	4	96	56	29	71	Данная работа
Кавказ	93	–	100	186	22	78	Ермаков и др., 2016 а, б
Среднее Поволжье	171	32	68	342	86	14	Ермаков и др., 2014; Закс и др., 2013
Верхнее Поволжье	90	83	17	180	94	6	Свинин и др., 2015; Замалетдинов и др., 2015

бореального горного фаунистических комплексов (Мирошниченко, 2011). Можно предположить, что проникновение в эту часть Горного Крыма особой озёрной лягушки из других районов полуострова затруднено, и фактор изоляции проявляется здесь в наибольшей степени. Иными словами, по имеющимся на сегодняшний день данным, распространение в Крыму озёрных лягушек «западной» митохондриальной линии может быть связано с наиболее стабильной на протяжении всей истории своего существования речной системой (в таком случае его характер, вероятнее всего, следует считать реликтовым), между тем как остальная часть полуострова по генетической структуре населения озёрных лягушек резко отличается от сопредельной Украины.

Таким образом, имеются основания считать, что территория Крыма могла быть заселена озёрными лягушками азиатской линии непосредственно с Кавказа (Кукушкин, 2013). В связи с этим заслуживает внимания гипотеза осушения Черноморской впадины в позднем эоплейстоцене, вследствие чего между Крымом и Западным Кавказом предположительно возникла кратковременная сухопутная связь (Андреев, 2010). Представленные факты могут свидетельствовать также о возможности нескольких разнонаправленных колонизационных волн форм *P. ridibundus* complex на протяжении плейстоцена и голоцена – вероятно, с участием обширных дельтовых систем, формировавшихся в регрессивные стадии Черноморского бассейна к юго-востоку и западу от Крыма (Палеогеография Европы..., 1987; Евсюков, 2007; Пасынкова, 2013; Yanina, 2014).

Обилие нерешенных вопросов, наряду с их важностью для понимания процессов интрогрессивной гибридизации в зонах вторичного контакта глубоко дивергировавших таксонов и уточнения четвертичных палеогеографических обстановок в Северном Причерноморье, указывает на необходимость дальнейшего изучения генетической структуры населения озёрных лягушек Крымского полуострова. В связи со сказанным выше, интерес в этом ключе представляют наиболее изолированные популяции, обитающие в западной части Южного берега, каньонах Главной гряды и на яйле, а в равнинной части Крыма – популяции азовского и черноморского побережий Керченского полуострова и некоторых степных сухоречий (таких как Чатырлык и Донузлавская балка), в сравнительно недавнем прошлом, вероятно, принадлежащих к

системе Пра-Днепра (Слудский, 1953; Позаченюк, 2012).

Благодарности

Авторы благодарят С. В. Леонова (Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь), А. А. Надольного (Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь) и Ю. А. Красиленко (Киев) за помощь при проведении экспедиционных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-97031 p_поволжье_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Атлас. Автономна Республіка Крим / Ін-т географії НАН України. Сімферополь ; Київ, 2003. 80 с.
- Андреев В. М. 2010. Проблема Понтиды и долины древних рек в Черном море // Геология и полезные ископаемые Мирового океана. № 2. С. 47 – 50.
- Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Скоринов Д. В. 2004. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоол. журн. Т. 83, № 8. С. 936 – 960.
- Евсюков Ю. Д. 2007. Геоморфологическая характеристика и история развития притаманской материковой окраины // Геология и полезные ископаемые Мирового океана. № 2. С. 86 – 97.
- Ермаков О. А., Закс М. М., Тутов С. В. 2013. Диагностика и распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. в Пензенской области (по данным анализа гена COI мтДНК) // Вестн. Тамб. ун-та. Сер. Естественные и технические науки. Т. 18, вып. 6. С. 2999 – 3002.
- Ермаков О. А., Файзулин А. И., Закс М. М., Кайбелева Э. И., Зарипова Ф. Ф. 2014. Распространение «западной» и «восточной» форм озерной лягушки *Pelophylax ridibundus* s. l. на территории Самарской и Саратовской областей (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 16, № 5-1. С. 409 – 412.
- Ермаков О. А., Симонов Е. П., Иванов А. Ю., Замалетдинов Р. И., Файзулин А. И. 2016 а. Генетические формы озёрной лягушки (*Pelophylax ridibundus* complex) Западного Кавказа по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК // Тр. Ин-та биологии внутренних вод РАН. Вып. 73 (76). Молекулярная генетика гидробионтов. Ярославль : Филигрань. С. 70 – 76.
- Ермаков О. А., Файзулин А. И., Аскендеров А. Д., Иванов А. Ю. 2016 б. Молекулярно-генетическая характеристика озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* Республики Дагестан (по данным анализа митохондриальной и ядерной ДНК) // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 18, № 5-1. С. 94 – 97.

- Закс М. М., Быстракова Н. В., Ермаков О. А., Тутов С. В. 2013. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика озерных лягушек (*Pelophylax ridibundus*) из Пензенской области // Современная герпетология : проблемы и пути их решения : ст. по материалам докл. Первой междунар. молодежной конф. герпетологов России и сопредельных стран / Зоол. ин-т РАН. СПб. С. 86 – 89.
- Замалетдинов Р. И., Павлов А. В., Закс М. М., Иванов А. С., Ермаков О. А. 2015. Молекулярно-генетическая характеристика лягушек *Pelophylax esculentus* комплекса на восточной периферии ареала (Поволжье, Республика Татарстан) // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. № 3(31). С. 54 – 66.
- Котенко Т. И. 2005. Влияние ирригации на герпетокомплексы в Крымском Присивашье // Біорізноманіття та роль зооценозу в природних і антропогенних екосистемах : матеріали III Міжнар. наук. конф. Дніпропетровськ : Вид-во Дніпропетр. нац. ун-ту. С. 392 – 394.
- Кукушкин О. В. 2013. Генезис герпетофауны Крыма : новое видение проблемы // Юбилейные зоологические чтения : материалы науч. конф. Симферополь : Изд-во Таврического нац. ун-та. С. 22 – 25.
- Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Боркин Л. Я., Скоринин Д. В. 2008. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран // Вопросы герпетологии : материалы Третьего съезда Герпетол. о-ва им. А. М. Никольского / Зоол. ин-т РАН. СПб. С. 247 – 257.
- Манило В. В. 2005. Миксоплоидия у *Rana ridibunda ridibunda* и *Rana esculenta* (Anura, Ranidae) из Житомирской области Украины // Матеріали Першої конф. Українського герпетологічного товариства / Зоомузей ННПМ НАН України. Київ. С. 99 – 104.
- Мирошниченко А. И. 2011. Паразитофауна рыб бассейна реки Черной // Заповедники Крыма. Биоразнообразии и охрана природы в Азово-Черноморском регионе : материалы VI междунар. науч.-практ. конф. Симферополь : Изд-во Таврического нац. ун-та. С. 310 – 322.
- Палеогеография Европы за последние сто тысяч лет. 1982. М. : Наука. 175 с.
- Пасынкова Л. А. 2013. Каньоны континентального склона Черного моря // Учен. зап. Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского. Сер. Геогр. Т. 26 (65). № 3. С. 260 – 266.
- Писанець Є., Кукушкін О. 2016. Земноводні Криму / Національний науково-природничий музей НАН України. Київ. 320 с.
- Позаченюк Е. А. 2012. Флористические связи Крыма с точки зрения позиционных отношений // Эко-системы, их оптимизация и охрана. Вып. 7. С. 11 – 21.
- Позаченюк Е. А. 2015. Ландшафтное разнообразие Крыма // Учен. зап. Крымского федерального ун-та им. В. И. Вернадского. Т. 1 (67), № 3. С. 37 – 50.
- Свинин А. О., Иванов А. Ю., Закс М. М., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я., Розанов Ю. М., Ермаков О. А. 2015. Распространение «западной» и «восточной» форм озёрной лягушки, *Pelophylax ridibundus*, и их участие в образовании полуклональных гибридов *P. esculentus* в республике Марий Эл // Современная герпетология. Т. 15, вып. 3/4. С. 120 – 129.
- Слудский А. Ф. 1953. Древние долины реки Салгир // Изв. Крымского отд-ния геогр. о-ва СССР. Вып. 2. С. 31 – 38.
- Сурядная Н. Н. 2002. Характеристика морфологической изменчивости озерной лягушки (*Rana ridibunda* Pall., 1771) с территории Крыма // Вісн. Запорізького держ. ун-ту. № 2. С. 148 – 153.
- Сурядная Н. Н. 2003. Материалы по кариологии зеленых лягушек (*Rana ridibunda* Pallas, 1771; *Rana lessonae* Camerano, 1882; *Rana esculenta* Linnaeus, 1758) с территории Украины // Вестн. зоологии. Т. 37, № 1. С. 33 – 40.
- Щербак Н. Н. 1966. Земноводные и пресмыкающиеся Крыма (=Herpetologia Taurica). Киев : Наук. думка, 240 с.
- Щербак Н. Н. 1984. Земноводные и пресмыкающиеся. Изучение фауны и численности наземных позвоночных Карадага (1981 – 1982) (заключительный отчет) // Летопись природы Карадагского государственного заповедника АН УССР. Т. 1, кн. 1, ч. 5. С. 4 – 32.
- Akin C., Bilgin C. C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S. N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., Plötner J. 2010. Phylogeographic patterns of genetic diversity in eastern Mediterranean water frogs have been determined by geological processes and climate change in the Late Cenozoic // J. Biogeography. Vol. 37, iss. 11. P. 2111 – 2124.
- Akin C. P., Bilgin C. C., Beerli P., Westaway R., Schreiber R., Mazepa G., Uzzell T., Plötner J. 2014. Do discordant mitochondrial and nuclear distribution patterns indicate introgression following secondary contact between Anatolian water frog lineages (*Pelophylax* cf. *bedriagae*) and European water frog lineage (*Pelophylax ridibundus*) in Anatolia? // Book of Abstracts of Ecology and Evolutionary Biology Symposium [Electronic resource]. Istanbul. URL: http://www.eebst2014.boun.edu.tr/EEB-ST-2014/Home_files/BookofAbstracts_EEBST_2014.pdf (дата обращения: 15.01.2017).
- Aljanabi S. M., Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research. Vol. 25. P. 4692 – 4693.
- Hoffmann A., Plötner J., Pruvost N. B., Christiansen D. G., Rothlisberger S., Choleva L., Mikulicek P., Cogalniceanu D., Sas-Kovacs I., Shabanov D., Morozov-Leonov S., Reyer H.-U. 2015. Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe // Molecular Ecology. Vol. 24, iss. 17. P. 4371 – 4391.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ

Plötner J. 2005. Die westpaläarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Bielefeld : Laurenti Verlag. 160 s.

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Spolsky C., Ohst T., Litvinchuk S. N., Guex G.-D., Reyer H.-U., Hotz H. 2008. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA : a case in western Palaeartic water frogs // J. of Evolutionary Biology. Vol. 21, iss. 3. P. 668 – 681.

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C. C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Gaston-Denis G., Litvinchuk S. N., Westaway R., Heinz-Ulrich R., Pruvost N., Hotz H. 2010. Genetic divergence and evolution of reproductive isolation in Eastern Mediterranean

water frogs // Evolution in Action / ed. M. Glaubrecht. Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag. P. 373 – 403.

Plötner J., Baier F., Akin C., Mazepa G., Schreiber R., Beerli P., Litvinchuk S. N., Bilgin C. C., Borkin L., Uzzell T. 2012. Genetic data reveal that water frogs of Cyprus (genus *Pelophylax*) are an endemic species of Messinian origin // Zoosystematics and Evolution. Vol. 88, № 2. P. 261 – 283.

Yanina T. A. 2014. The Ponto-Caspian region : Environmental consequences of climate change during the Late Pleistocene // Quaternary International. Vol. 345. P. 88 – 99.

Образец для цитирования:

Файзулин А. И., Кукушкин О. В., Иванов А. Ю., Ермаков О. А. 2017. Предварительные данные о молекулярно-генетической структуре *Pelophylax ridibundus* (Amphibia, Anura, Ranidae) южной части Крымского полуострова по результатам анализа митохондриальной и ядерной ДНК // Современная герпетология. Т. 17, вып. 1/2. С. 56 – 65. DOI: 10.18500/1814-6090-2017-17-1-2-56-65.

PRELIMINARY DATA ON THE MOLECULAR GENETIC STRUCTURE OF *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (AMPHIBIA: ANURA: RANIDAE) FROM THE SOUTHERN PART OF THE CRIMEAN PENINSULA, BASED ON MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR DNA ANALYSIS

A. I. Faizulin¹, O. V. Kukushkin^{2,3}, A. Yu. Ivanov⁴, and O. A. Ermakov⁴

¹ Institute of Ecology of the Volga River Basin, Russian Academy of Sciences
10 Komzin Str., Togliatti 445003, Russia
E-mail: alexandr-faizulin@yandex.ru

² T. I. Vyazemski Karadag Scientific Station – Nature Reserve of Russian Academy of Sciences
24 Nauki Str., Stm. Kurortnoe, Theodosia 298188, Russia

³ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences
1 Universitetskaya Emb., Saint Petersburg 199034, Russia

⁴ Penza State University
40 Krasnaya Str., Penza 44026, Russia

Molecular genetic analysis of 28 marsh frogs *Pelophylax ridibundus* complex from 12 localities of the Crimean peninsula was conducted by two molecular markers, namely, *COI*, the gene of the first subunit of cytochrome oxidase mtDNA, and *SAL-1*, the first intron of the serum albumin gene nDNA. It has been found that the mtDNA type specific for the “eastern” form (the Anatolian *P. cf. bedriagae*) prevails for the Crimean marsh frogs, while the mtDNA type of the “western” form (the Central-European *P. ridibundus*) has been observed in a single case in the Chernaya River basin (the southwestern Crimea). At the same time, our nuclear marker analysis has revealed the presence of the “western” form alleles within the studied area which occurs there more rarely than the “eastern” one (in a 2:5 frequency ratio). The alleles of the “western” form were identified in contrasting landscape zones and various altitude-climatic belts of the peninsula which might give evidence of the occurrence of multidirectional colonization waves of *P. ridibundus* in the Pleistocene-Holocene epoch.

Key words: *Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax cf. bedriagae*, cytochrome oxidase, serum albumin, Chernaya River basin, Crimea.

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 14-04-97031 r_povolzhie_a).

REFERENCES

- Atlas. Autonomous Republic of the Crimea*. Eds. M. V. Bagrov, L. G. Rudenko. Simferopol; Kyiv, 2003. 80 p. (in Ukrainian).
- Andreev V. M. Issue of Pontida and Valleys of Ancient Rivers in the Black Sea. *Geology and Mineral Resources of World Ocean*, 2010, no. 2, pp. 47–50 (in Russian).
- Borkin L. Ya., Litvinchuk S. N., Rozanov Yu. M., Skorinov D. V. On Cryptic Species (from the example of Amphibians). *Zoologicheskii zhurnal*, 2004, vol. 83, no. 8, pp. 936–960 (in Russian).
- Evsyukov Y. D. Geomorphological characteristic and history of development of mainland edge of Taman' Peninsula. *Geology and Mineral Resources of World Ocean*, 2007, no. 2, pp. 86–97 (in Russian).
- 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 Penza Province (on data of analysis of mtDNA cytochrome oxidase gene). *Tambov University Reports. Series Natural and Technical Sciences*, 2013, vol. 18, iss. 6, pp. 2999–3002 (in Russian).
- 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, vol. 16, no. 5-1, pp. 409–412 (in Russian).
- Ermakov O. A., Simonov E. P., Ivanov A. Ju., Zamaletdinov R. I., Fayzulin A. I. Genetic Characteristics of Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus* complex) from the Western Caucasus Based on Mitochondrial and Nuclear DNA data. *Transactions of I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS "Molecular genetics of aquatic organisms"*, 2016 a, iss. 73 (76), pp. 70 – 76 (in Russian).
- Ermakov O. A., Fayzulin A. I., Askenderov A. D., Ivanov A. Ju. Molecular-genetic Characteristics of Marsh Frog from the Republic of Dagestan (based on mitochondrial and nuclear DNA data). *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 2016 b, vol. 18, no. 5-1, pp. 94–97 (in Russian).
- 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, Zoological institute of RAS Publ., 2013, pp. 86–89 (in Russian).
- Zamaletdinov R. I., Pavlov A. V., Zaks M. M., Ivanov A. Y., Ermakov O. A. Molecular-genetic characteristic of *Pelophylax esculentus* complex from the eastern range of distribution (Volga region, Tatarstan Republic). *Tomsk State University J. of Biology*, 2015, no. 3 (31), pp. 54–66 (in Russian).
- Kotenko T. I. Vliianie irrigatsii na gerpetokompleksy v Krymskom Prisivash'e [Impact of Irrigation on Herpetological Assemblages in the Crimean Sivash Region]. *Materiali III Mizhnar. nauk. konf "Bioriznomanit-tia ta rol' zootsenozu v prirodnikh i antrpogennikh ekosistemakh"* [Proc. III Intern. Scientific Conf. "Biodiversity and Function of Zoocenosis in Nature and Anthropogenic Ecosystems"]. Dnipropetrovsk, Dnipropetrovsk National University Press, 2005. pp. 392 – 394 (in Russian).
- Kukushkin O. V. Genезis gerpetofauny Kryma: novoe videnie problemy [Genesis of the Crimean Herpetofauna: a New Vision of the Problem]. In: *Materialy nauch. konf. "Iubileinye zoologicheskie chteniia"* [Proc. of the Intern. Scientific Conference Devoted to 100th anniversary of S. L. Delyamure and 90th anniversary of S. A. Skryabin "Commemorative Zoological Readings"]. Simferopol, 2013. pp. 22 – 25 (in Russian).
- 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. *Proc. of the 3 th Meeting of the Nikolsky Herpetological Society "The Problems of Herpetology"*. Saint-Petersburg, 2008, pp. 247–257 (in Russian).
- Manilo V. V. Mixoploidy in *Rana ridibunda ridibunda* and *Rana esculenta* (Anura, Ranidae) from Zhitomir Region of Ukraine. *Proc. of the 1th Conference of the Ukrainian Herpetological Societ*. Kyiv, 2005, pp. 99–104 (in Russian).
- Miroshnichenko A. I. Parazitofauna ryb basseina reki Chernoi [Parasitofauna of the Fisch from the Chernaya River Basin]. *Materialy VI Mezhdunar. nauch.-prakt. konf. "Zapovedniki Kryma. Bioraznoobrazie i okhrana prirody v Azovo-Chernomorskom regione"* [Proc. of VI Intern. Scientific-practical Conf. "Reserves of the Crimea. Biodiversity and Protection of Nature in Azov – Black Sea Region"]. Simferopol, Taurida National University Press, 2011, pp. 310–322 (in Russian).
- Paleogeography of Europe During the Last one Hundred Thousand Years*. Moscow, Nauka, 1982. 175 p. (in Russian).
- Pasynkova L. A. 2013. Canyons of the Continental Slope of the Black Sea. *Scientific notes of V. I. Vernadsky Taurida National University. Ser. Geography*, 2013, vol. 26 (65), no. 3, pp. 260–266 (in Russian).
- Pysanets E., Kukushkin O. *Amphibians of the Crimea*. Kyiv, National Museum of Natural History, 2016. 320 p.
- Pozachenyuk K. A. Floristic Relations of Crimea in Terms of Positional Relationship. *Optimization and Protection of Ecosystems*, 2012, iss. 7, pp. 11–21 (in Russian).
- Pozachenyuk E. A. Landscape Diversity of the Crimea. *Scientific notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University*, 2015, vol. 1 (67), no. 3, pp. 37–50 (in Russian).

Svinin A. O., Ivanov A. Yu., Zaks M. M., Litvinchuk S. N., Borkin L. J., Rosanov J. M., Ermakov O. A. Distribution of the «eastern» and «western» forms of the Marsh Frog, *Pelophylax ridibundus*, and Their Participation in the Origin of Hemiclinal Hybrids, *P. esculentus* in Mari El Republic. *Current Studies in Herpetology*, 2015, vol. 15, iss. 3–4, pp. 120–129.

Sludsky A. F. Ancient Valleys of Salgir River. *Bull. of the Crimean Branch of Geographical Society of the USSR*, 1953, iss. 2, pp. 31–38 (in Russian).

Suryadnaya N. N. Characteristic of Morphological Variability of the Marsh Frog (*Rana ridibunda* Pall., 1771) from the Crimean Territory. *Visnyk of Zaporizhzhya National University. Biological Sciences*, 2002, no. 2, pp. 148–153 (in Russian).

Suryadna N. N. The Data on Caryology of Green Frogs (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*, *R. esculenta*) from Ukraine. *Vestnik Zoologii*, 2003, vol. 37, no. 1, pp. 33–40 (in Russian).

Szczerbak N. N. *Zemnovodnye i presmykaiushchiesia Kryma (=Herpetologia Taurica)* [Amphibians and Reptiles of the Crimea (=Herpetologia Taurica)]. Kiev, Naukova dumka, 1966. 240 p. (in Russian).

Szczerbak N. N. 1984. *Zemnovodnye i presmykaiushchiesia. Izuchenie fauny i chislenosti nazemnykh pozvonochnykh Karadaga (1981 – 1982) (zaklyuchitel'nyi otchet)* [Amphibians and Reptiles. The study of Terrestrial Vertebrates Fauna and Abundance at Karadag (1981 – 1982) (final report)]. *Letopis' prirody Karadagskogo gosudarstvennogo zapovednika AN USSR* [Annals of Nature of Karadag State Reserve of Academy of Sciences of Ukrainian SSR], 1984, vol. 1, book 1, part 5, pp. 4–32 (in Russian, unpublished).

Akin C., Bilgin C. C., Beerli P., Westaway R., Ohst T., Litvinchuk S. N., Uzzell T., Bilgin M., Hotz H., Guex G.-D., Plötner J. Phylogeographic Patterns of Genetic Diversity in Eastern Mediterranean Water Frogs Have Been Determined by Geological Processes and Climate Change in the Late Cenozoic. *J. Biogeography*, 2010, vol. 37, iss. 11, pp. 2111–2124.

Akin C. P., Bilgin C. C., Beerli P., Westaway R., Schreiber R., Mazepa G., Uzzell T., Plötner J. Do Discordant Mitochondrial and Nuclear Distribution Patterns Indicate Introgression Following Secondary Contact Be-

tween Anatolian Water Frog Lineages (*Pelophylax cf. bedriagae*) and European Water Frog Lineage (*Pelophylax ridibundus*) in Anatolia? *Book of Abstracts of Ecology and Evolutionary Biology Symposium*. Istanbul, 2014. Available at: http://www.eebst2014.boun.edu.tr/EEB-ST-2014/Home_files/BookofAbstracts_EEBST2014.pdf (accessed 15 January 2017).

Aljanabi S. M., Martinez I. Universal and Rapid Salt-extraction of High Genomic DNA for PCR-based Techniques. *Nucleic Acids Research*, 1997, vol. 25, pp. 4692–4693.

Hoffmann A., Plötner J., Pruvost N. B., Christensen D. G., Rothlisberger S., Choleva L., Mikulicek P., Cogalniceanu D., Sas-Kovacs I., Shabanov D., Morozov-Leonov S., Reyer H.-U. Genetic Diversity and Distribution Patterns of Diploid and Polyploid Hybrid Water Frog Populations (*Pelophylax esculentus* complex) Across Europe. *Molecular Ecology*, 2015, vol. 24, iss. 17, pp. 4371–4391.

Plötner J. *Die westpaläarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation*. Bielefeld, Laurenti Verlag, 2005. 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 Palaearctic Water Frogs. *J. of Evolutionary Biology*, 2008, vol. 21, iss. 3, pp. 668–681.

Plötner J., Uzzell T., Beerli P., Akin C., Bilgin C. C., Haefeli C., Ohst T., Köhler F., Schreiber R., Gaston-Denis G., Litvinchuk S. N., Westaway R., Heinz-Ulrich R., Pruvost N., Hotz H. 2010. Genetic Divergence and Evolution of Reproductive Isolation in Eastern Mediterranean Water Frogs. In: *Evolution in Action*. Ed. M. Glaubrecht. Berlin; Heidelberg, Springer-Verlag, 2010, pp. 373–403.

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. *Zoosystematics and Evolution*, 2012, vol. 88, no. 2, pp. 261–283.

Yanina T. A. The Ponto-Caspian Region: Environmental Consequences of Climate Change During the Late Pleistocene. *Quaternary International*, 2014, vol. 345, pp. 88–99.

Cite this article as:

Faizulin A. I., Kukushkin O. V., Ivanov A. Yu., Ermakov O. A. Preliminary Data on the Molecular Genetic Structure of *Pelophylax ridibundus* (Amphibia: Anura: Ranidae) from the Southern Part of the Crimean Peninsula, Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Analysis. *Current Studies in Herpetology*, 2017, vol. 17, iss. 1 – 2, pp. 56–65 (in Russian). DOI: 10.18500/1814-6090-2017-17-1-2-56-65.
