

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ «ЗАПАДНОЙ» И «ВОСТОЧНОЙ» ФОРМ ОЗЁРНОЙ ЛЯГУШКИ,
PELOPHYLAX RIDIBUNDUS, И ИХ УЧАСТИЕ В ОБРАЗОВАНИИ
ПОЛУКЛОНАЛЬНЫХ ГИБРИДОВ *P. ESCULENTUS* В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ**

А. О. Свинин¹, А. Ю. Иванов², М. М. Закс², С. Н. Литвинчук³,
Л. Я. Боркин⁴, Ю. М. Розанов³, О. А. Ермаков²

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет
Россия, 420008, Казань, Кремлевская, 18
E-mail: ranaesc@gmail.com

² Пензенский государственный университет
Россия, 440026, Пенза, Красная, 40
E-mail: oaermakov@list.ru

³ Институт цитологии РАН
Россия, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4
E-mail: slitvinchuk@yahoo.com, rozanov@mail.cytspb.rssi.ru

⁴ Зоологический институт РАН
Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 1
E-mail: lacerta@zin.ru

Поступила в редакцию 09.10.2014 г.

Проведен молекулярно-генетический анализ 67 особей *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) и 63 особей *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) из Марий Эл (15 пунктов) и Кировской области (1 пункт) по двум (митохондриальный и ядерный) маркерам. Часть материала (66 лягушек) была изучена с помощью проточной ДНК-цитометрии. Показано, что у озёрных лягушек, обитающих на севере Среднего Поволжья, преобладают генетические маркеры, специфичные для «западной» (= центрально-европейская *P. ridibundus*) формы. Аллели «восточной» формы (= азиатская *P. cf. bedriagae*) здесь встречаются значительно реже, чем в более южных районах Поволжья. У съедобной лягушки найдены все три типа мтДНК: «восточной» и «западной» форм озёрной лягушки и прудовой лягушки. Аллели яДНК, характерные для «восточной» формы озёрной лягушки, были выявлены лишь у двух экземпляров *P. esculentus* из двух локалитетов. Обсуждается соотношение вариантов яДНК и типов продуцируемых гамет у гибридов.

Ключевые слова: зелёные лягушки, *Pelophylax esculentus* комплекс, цитохром оксидаза, сывороточный альбумин, проточная ДНК-цитометрия, распространение, Марий Эл.

ВВЕДЕНИЕ

На территории Среднего Поволжья распространены три вида зелёных лягушек рода *Pelophylax* Fitzinger, 1843: озёрная лягушка, *P. ridibundus* (Pallas, 1771), прудовая лягушка, *P. lessonae* (Camerano, 1882) и съедобная лягушка, *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), объединяемые в комплекс *P. esculentus* (Plötner, 2005).

Как было недавно показано (Ермаков и др., 2013; Закс и др., 2013), озёрная лягушка в Среднем Поволжье представлена двумя генетически дифференцированными формами – «западной» и «восточной», выделенными ранее в ходе изучения изменчивости размера генома (Литвинчук и др., 2008). Сравнение первичных последовательностей фрагментов ядерного (*SAI*) и митохондриального (*COI*) генов озёрных лягушек, обитающих на территории Поволжья, с последовательностями из баз данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov; Plötner et

al., 2009, 2012) и BOLD (www.boldsystems.org) позволяет соотносить «западную» форму с центрально-европейской *P. ridibundus*, а «восточную» – с азиатской *P. cf. bedriagae*.

В связи с этим возникает вопрос о распространении обеих криптических форм озёрной лягушки на востоке Европы и, в частности, в Волжском бассейне. Остается также открытой важная проблема о границах распространения и интенсивности гибридизации, т.е. о ширине гибридной зоны и соотношении частот аллелей «западной» и «восточной» форм.

Съедобная лягушка, *P. esculentus* имеет ряд важных генетических особенностей, которые выделяют ее среди других позвоночных Европы. Этот таксон произошел в результате гибридизации родительских видов – озёрной и прудовой лягушек (Berger, 1968, 1970), размножается полуклонально (Боркин и др., 1987; Tunner, 1974), про-

дуцируя при этом разные типы гамет (Uzzell et al., 1977; Vinogradov et al., 1991) и образуя с родительскими видами смешанные популяционные системы (Лада и др., 2011; Uzzell, Berger, 1975; Uzzell et al., 1977), а также имеет несколько уровней плоидности (Günther, 1975; Borkin et al., 2004). Ареал съедобной лягушки в ряде регионов Европы выходит за пределы распространения ее родительских видов (Borkin et al., 2002; Christiansen, 2010).

В связи с выявлением двух форм озёрной лягушки интересна их роль в формировании генетической структуры гибридогенной *P. esculentus*. Поэтому необходимо изучение генетических характеристик видов, в особенности съедобной и озёрной лягушек, для понимания общей картины межвидовых взаимоотношений в комплексе, которая до сих пор окончательно не выяснена.

Таким образом, в задачи настоящего исследования входило изучение распределения маркеров митохондриальной и ядерной ДНК (далее мт- и яДНК) «восточной» и «западной» форм у озёрной лягушки в Марий Эл и выявление частоты их встречаемости у *P. esculentus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала был проведен в 2011 – 2015 гг. Всего молекулярно-генетическим методом исследовано 130 особей из 16 локалитетов Кировской области и Республики Марий Эл, в том числе 67 особей *P. ridibundus* из 12 пунктов и 63 особи *P. esculentus* из 9 пунктов (номера мест сбора соответствуют таковым на картах, рис. 1 и 2):

1. Кировская область, Кикнурский район, пос. Малое Шарыгино (57°17' с.ш., 47°13' в.д.), R система, *P. ridibundus*, $n = 6$ (5♂♂ и 1♀).

2. Марий Эл, Оршанский район, пос. Велюкполе (56°49' с.ш., 48°4' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 4$ (1♂ и 3♀♀).

3. Марий Эл, Оршанский район, пос. Ошламучаш (56°48' с.ш., 47°45' в.д.), L-E система, *P. esculentus*, $n = 2$ (1♂ и 2♀♀).

4. Марий Эл, Медведевский район, пос. Кугуван (56°47' с.ш., 47°46' в.д.), L-E система, *P. esculentus*, $n = 19$ (15♂♂ и 4♀♀).

5. Марий Эл, Медведевский район, дер. Ну-жъялы, (56°47' с.ш., 47°39' в.д.), R-L система, *P. ridibundus*, $n = 2$ (1♂ и 1♀).

6. Марий Эл, Советский район, урочище Манан-Дур (56°45' с.ш., 48°15' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 2$ (♂♂), *P. esculentus*, $n = 3$ (1♂ и 2 sad.).

7. Марий Эл, Медведевский район, пос. Цибикнур (56°44' с.ш., 47°48' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 1$ (♂), *P. esculentus*, $n = 3$ (1♂ и 2♀♀).

8. Марий Эл, Килемарский район, заповедник «Большая Кокшага», пос. Шушер (56°40' с.ш., 47°15' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 4$ (♂♂), *P. esculentus*, $n = 9$ (8♂♂ и 1♀).

9. Марий Эл, Килемарский район, заповедник «Большая Кокшага», пос. Шаптунга (56°39' с.ш., 47°15' в.д.), L-E система, *P. esculentus*, $n = 2$ (♂♂).

10. Марий Эл, Медведевский район, п.г.т. Медведево (56°38' с.ш., 47°44' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 24$ (16♂♂; 7♀♀; 1 sad.), *P. esculentus*, $n = 4$ (3♂♂ и 1 sad.).

11. Марий Эл, Медведевский район, пос. Паганур (56°38' с.ш., 47°5' в.д.), R-L? система, *P. ridibundus*, $n = 1$ (1♂).

12. Марий Эл, г. Йошкар-Ола, лесопарк «Сосновая роща» (56°37' с.ш., 47°55' в.д.), R система, *P. ridibundus*, $n = 5$ (♂♂).

13. Марий Эл, г. Йошкар-Ола, микрорайон «Чихайдарово» (56°36' с.ш., 47°53' в.д.), R система, *P. ridibundus*, $n = 5$ (♂♂).

14. Марий Эл, Медведевский район, пос. Старожильск (56°34' с.ш., 47°18' в.д.), L-E система, *P. esculentus*, $n = 3$ (2♂ и 1 sad.).

15. Марий Эл, Горномарийский район, пос. Чермышево (56°11' с.ш., 46°30' в.д.), R-E-L система, *P. ridibundus*, $n = 10$ (7♂♂ и 3♀♀), *P. esculentus*, $n = 18$ (13♂♂ и 5♀♀).

16. Марий Эл, Волжский район, оз. Яльчик (56°00' с.ш., 48°24' в.д.), R система, *P. ridibundus*, $n = 3$ (1♂ и 2♀♀).

В качестве образцов тканей для выделения ДНК брали первые две фаланги IV пальца задних конечностей. Молекулярно-генетический анализ проведен в лаборатории молекулярной экологии и систематики животных при кафедре зоологии и экологии Пензенского государственного университета по методикам, указанным ранее (Ермаков и др., 2013; Закс и др., 2013).

Использовались два молекулярно-генетических маркера: для анализа материнских линий – фрагмент первой субъединицы гена цитохром оксидазы *COI* мтДНК («DNA barcodes», Hebert et al., 2003), для идентификации криптических форм и их гибридов на геномном уровне – интрон 1 гена сывороточного альбумина *SAL-1* яДНК (Plötner et al., 2009).

Часть материала (21 озёрная и 45 съедобных лягушек) была определена с помощью проточной ДНК-цитометрии. Все эти особи оказались диплоидными. Описание метода приведено ранее (Vinogradov et al., 1990, 1991; Borkin et al., 2001). Как было показано во многих наших работах, размер генома является одним из наиболее надежных па-

раметров для видовой идентификации особей зелёных лягушек и их пloidности, так как его значения не перекрываются у трех видов, обитающих на востоке Европы (например, Боркин и др., 1987; Свинин и др., 2013; Borkin et al., 2002, 2004).

Во всех остальных случаях определение особей проводилось по морфологическим признакам (Борисовский и др., 2000; Plötner, 2005).

Тип продуцируемых гамет у самцов *P. esculentus* ($n = 20$) был определен с помощью проточной ДНК-цитометрии (Vinogradov et al., 1990), тогда как у самок *P. esculentus* ($n = 6$) – с помощью электрофореза белков (LDH), выделенных из ооцитов (Uzzell et al., 1980). Данные исследования были проведены в Институте цитологии РАН.

Для сравнения частот аллелей был использован χ^2 -критерий, в случае малых выборок рассчитывался χ^2 -критерий с поправкой Йейтса для четырехпольных таблиц (Sokal, Rohlf, 1981).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Распространение «восточной» и «западной» форм озёрной лягушки

Молекулярно-генетический анализ выборок озёрных лягушек (табл. 1) показал преобладание в исследованном регионе маркеров мт- и яДНК «западной» формы. Аллели яДНК «восточной» формы были выявлены лишь в одном пункте (Медведево) (рис. 1). Здесь их нашли у шести экземпляров (из 24), причем все они были гетерозиготами, т.е. содержали два различных аллеля гена *SAT-1* – «западный» и «восточный». Несколько шире распространен «восточный» тип мтДНК, который был обнаружен у озёрной лягушки в четырех локалитетах (Сосновая роща, Чихайдарово, Чермышьево и Медведево).

По всей видимости, р. Волга не лимитирует распространение аллелей «восточной» формы озёрной лягушки, что также подтверждается полученными данными по распространению этих форм *P. ridibundus* в Республике Татарстан (Замалетдинов и др., 2015).

Кроме того, полученные нами данные подкрепляют сделанное ранее предположение о том, что «восточная» форма может быть приурочена к антропогенным ландшафтам (Ермаков и др., 2013): так как все наши находки особей, имеющих мтДНК или яДНК «восточной» формы, относятся к окрестностям г. Йошкар-Ола.

В отличие от особей с генами «восточной» формы, лягушки, содержащие мтДНК и яДНК «западной» формы, заселяют все обследованные локалитеты.

Таблица 1

Распределение типов мт- и яДНК у особей *P. ridibundus* ($n = 61$)

Локалитет	n	COI мтДНК		
		R		B
		SAT-1 яДНК		
		RR	RB	RR
Великополье	4	4	–	–
Малое Шарыгино	6	6	–	–
Манан-Дур	2	2	–	–
Медведево	24	16	6	2
Нужьялы	2	2	–	–
Паганур	1	1	–	–
Сосновая роща	5	4	–	1
Цибикнур	1	1	–	–
Чермышьево	10	7	–	3
Чихайдарово	5	4	–	1
Шушер	4	4	–	–
Яльчик	3	3	–	–
Итого	67 (100%)	54 (81%)	6 (9%)	7 (10%)

Примечание. R – аллели яДНК и гаплотипы мтДНК «западной» формы озёрной лягушки, B – аллели яДНК и гаплотипы мтДНК «восточной» формы.

Сравнение частот гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК с данными, полученными ранее (табл. 2), показало, что на севере Среднего Поволжья генетические маркеры, специфичные для «восточной» формы, встречаются значительно реже, чем в более южных областях. Статистически подтвержденное преобладание «западных» генетических маркеров в большей степени выявлено по мтДНК (Марий Эл, Самарская и Саратовская области: $\chi^2 = 38.91, p < 0.01$; Марий Эл и Пензенская область: $\chi^2 = 58.53, p < 0.01$; Марий Эл и Татарстан: $\chi^2 = 5.65, p < 0.05$), в меньшей – по яДНК (Марий Эл и Пензенская область: $\chi^2 = 9.45, p < 0.01$; Марий Эл и Калужская область: $\chi^2 = 18.79, p < 0.01$).

Озёрная лягушка – широкоареальный вид, имеющий высокую экологическую пластичность. Её ареал увеличивается также за счет популяций интродуцентов. В настоящее время популяции интродуцированных *P. ridibundus*, интродуцированные вне нативного ареала вида, встречаются в Якутске (Белимов, Седалищев, 1980), Екатеринбурге (Вершинин, 1990), на Алтае (Яковлев, Малков, 1985; Яковлев, 1990) и Камчатке (Бухалова, Велигура, 2007; Ляпков, 2014; наши данные), при этом популяции в Якутске и Петропавловске-Камчатском занесены в каталог редких позвоночных животных России (Ильяшенко и др., 2014). Озёрная лягушка была интродуцирована также в Швейцарии (Blankenhorn, 1973) и в Латвии (Цауне, 1987).

РАСПРОСТРАНЕНИЕ «ЗАПАДНОЙ» И «ВОСТОЧНОЙ» ФОРМ ОЗЁРНОЙ ЛЯГУШКИ

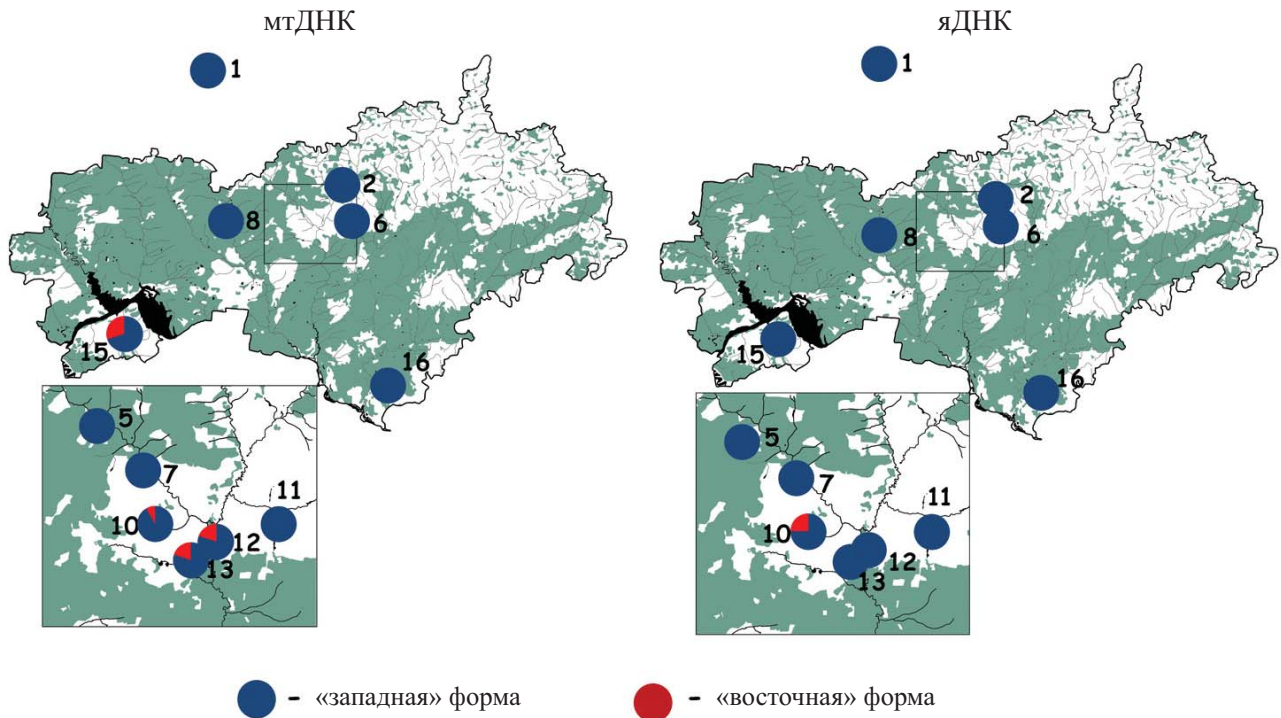


Рис. 1. Распространение гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК «западной» и «восточной» форм *P. ridibundus*; приведена карта-схема Марий Эл и окрестностей г. Йошкар-Ола (выноски)

С помощью биохимических и молекулярно-генетических методов во Франции (Pagano et al., 2003), Бельгии (Holsbeek et al., 2008) и Швейцарии (Dubey et al., 2014) была выявлена активная инвазия различных форм озёрной лягушки в новые регионы. Среди интродуцентов часто оказывается «восточная» форма озёрной лягушки, *P. cf. bedriagae* (Holsbeek et al., 2008; Dubey et al., 2014). Так, например, в Швейцарии озёрной лягушки не было до 1950-х гг. Интродуцированная *P. ridibundus*, в том числе и «восточная» форма, вытесняет автохтонные виды зелёных лягушек (съедобную и прудовую), и в настоящее время обсуждается во-

прос об их охране (Holsbeek et al., 2008; Leuenberger et al., 2014).

Вопрос о статусе «восточной» формы в Марий Эл остается открытым: представляет ли она особей, интродуцированных человеком, или появилась здесь в результате естественного расселения? С одной стороны, в пользу интродукции «восточной» формы свидетельствует ее спорадическое распространение по территории и приуроченность к г. Йошкар-Ола, а также обитание на территории (Чермышевское водохранилище), прилегающей к городам (Козьмодемьянск либо Васильсурск).

С другой стороны, озёрная лягушка характеризуется высокими способностями к самостоятельному расселению. Например, за короткие сроки данный вид продвинулся на значительные расстояния в Алтайском крае России (Яковлев, 1990) и Казахстане (Дуйсебаева и др., 2005). Это может свидетельствовать в пользу распространения аллелей «восточной» формы на север (например, по руслу Волги) из южной

Соотношение «западных» (R) и «восточных» (B) гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК у *P. ridibundus* в изученных

Таблица 2

Регион	n	R, %	B, %	Публикация
мтДНК				
Марий Эл	67	90	10	Данная работа
Татарстан	23	65	35	Замалетдинов и др., 2015
Самарская и Саратовская области	71	37	63	Ермаков и др., 2014
Калужская область	34	100	0	Иванов и др., 2015
Пензенская область	100	29	71	Ермаков и др., 2013
яДНК				
Марий Эл	134	96	4	Данная работа
Татарстан	46	89	11	Замалетдинов и др., 2015
Самарская и Саратовская области	142	89	11	Ермаков и др., 2014
Калужская область	68	74	26	Иванов и др., 2015
Пензенская область	200	84	16	Закс и др., 2013

части Среднего Поволжья, где они встречаются чаще (Ермаков и др., 2013, 2014).

Озёрная лягушка в Поволжье, т.е. на северо-восточной периферии ареала, в отличие от северо-запада Восточно-Европейской равнины, распространена севернее, чем прудовая лягушка (Borkin et al., 2002). Данное обстоятельство может быть связано с тем, что на северо-востоке ареала озёрная лягушка, избегающая крупных лесных массивов, характерных для территории Кировской и Нижегородской областей, представляет собой реликтовые популяции, сохранившиеся от предыдущих эпох (Borkin et al., 2002). В таком случае наличие «восточной» формы на северо-восточной периферии ареала крайне интересно, так как оно очерчивает минимальные временные границы момента ее появления на данной территории. Тем не менее возможен также вариант недавнего заселения территорий в связи с вырубкой лесов. Дальнейший генетический анализ популяций в регионе поможет пролить свет на данную проблему.

Генетическая характеристика съедобной лягушки

Гаплотипы мтДНК у *P. esculentus* и их встречаемость в разных популяционных системах. У особей съедобной лягушки нами найдены три типа мтДНК: прудовой лягушки и «восточной» и «западной» форм озёрной лягушки (рис. 2, табл. 3). При этом 29 особей (46%) *P. esculentus* со-

держали мтДНК «западной» формы, 6 особей (10%) – мтДНК «восточной» формы озёрной лягушки и 28 особей (44%) имели гаплотипы прудовой лягушки (см. табл. 3).

В популяционной системе R-E-L типа из пос. Чермышьево ($n = 18$) 22% *P. esculentus* содержали мтДНК «восточной» формы и 72% особей имели мтДНК «западной» формы (см. табл. 3,

Таблица 3
Распределение типов мт- и яДНК у особей съедобной лягушки

Локалитет и тип ПС		n	COI мтДНК					
			R		L		B	
			RL	BL	RL	RL	BL	
Медведево	R-E-L	4	–	–	2	1	1	
Цибикнур	R-E-L	3	2	–	1	–	–	
Манан-Дур	R-E-L	3	2	–	1	–	–	
Чермышьево	R-E-L	18	13	1	–	4	–	
Шушер	R-E-L	9	4	–	5	–	–	
Шапгунга	L-E	2	2	–	–	–	–	
Старожильск	L-E	3	2	–	1	–	–	
Кугуван	L-E	19	2	–	17	–	–	
Ошламучаш	L-E	2	1	–	1	–	–	
Всего		63	28	1	28	5	1	
		(100%)	(44%)	(2%)	(44%)	(8%)	(2%)	

Примечание. R – аллели яДНК и гаплотипы мтДНК «западной» формы озёрной лягушки, B – аллели яДНК и гаплотипы мтДНК «восточной» формы, L – аллели яДНК и гаплотипы мтДНК «прудовой» лягушки, n – число особей.

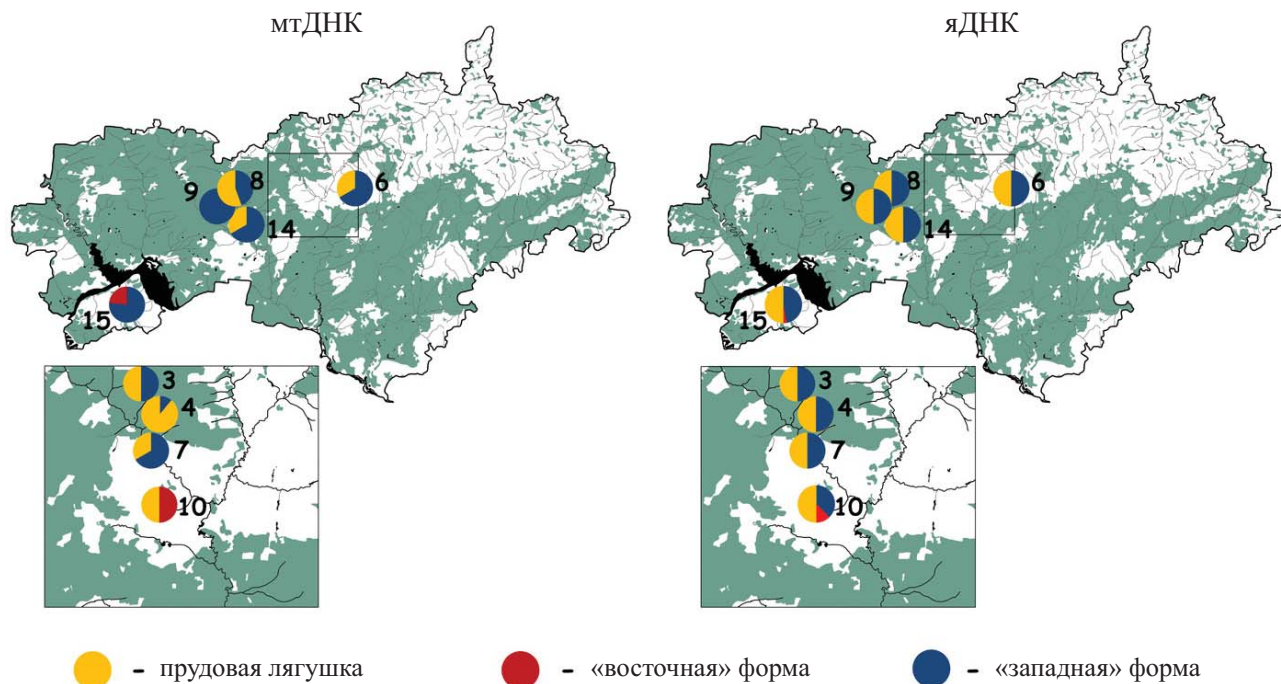


Рис. 2. Распределение гаплотипов мтДНК и аллелей яДНК *P. esculentus* в выборках; приведена карта-схема Марий Эл и окрестностей г. Йошкар-Ола (выноска)

рис. 2). В трех других системах этого же типа (урочище Манан-Дур, поселки Цибикинур и Шушер) генетические маркеры «восточной» формы не найдены и *P. esculentus* содержали мтДНК только «западной» формы. В пос. Цибикинур ($n = 3$) аллели мтДНК «западной» формы были встречены у 70%, в пос. Шушер ($n = 9$) – у 44%, в урочище Манан-Дур ($n = 3$) – у 67%.

У *P. esculentus* из популяционной системы R-E типа в пос. Медведево не найдены аллели мтДНК «западной» формы, что, скорее всего, связано с небольшой выборкой гибридных особей ($n = 4$), так как «западная» форма была найдена в данной популяции. Аллели мтДНК «восточной» формы и прудовой лягушки в этой выборке имели равное соотношение.

В популяционных системах L-E типа найдены аллели только «западной» формы. В системе L-E типа из пос. Кугуван ($n = 19$) 11% *P. esculentus* содержали мтДНК «западной» формы, из пос. Старожильск ($n = 3$) – 67%, а из окрестностей пос. Шапгунга ($n = 2$) – 100%. Однако в последних двух точках объем выборки был весьма мал и данный факт нуждается в дальнейшем изучении.

Нахождение в L-E системах мтДНК озёрной лягушки свидетельствует об участии самок съедобной лягушки в размножении.

Распространение аллелей ядерной ДНК. У съедобной лягушки отмечены оба варианта ядерного генома озёрной лягушки (как «восточной», так и «западной» формы). Маркеры яДНК, характерные для «восточной» озёрной лягушки, были найдены лишь у двух экземпляров *P. esculentus* – самца из Чермышево и самки из п.г.т. Медведево (см. табл. 3, рис. 2). Эта самка также имела и мтДНК «восточной» формы.

Следует отметить, что у съедобной лягушки маркеры «восточной» формы встречались только там, где они были выявлены у озёрной лягушки (Медведево, Чермышево). Напротив, в локалитетах, где встречалась только «западная» форма озёрной лягушки (Шушер), съедобные лягушки содержали мт- и яДНК исключительно этой формы (см. рис. 2).

В исследованных нами популяционных системах найдены не только *P. esculentus*, наследующие геном озёрной лягушки, но и гибридные особи, получившие геном от прудовой лягушки. Особи *P. esculentus*, наследующие *lessonae*-геном, размножаются с озёрной лягушкой и потому содержат имеющийся в популяции геном озёрной лягушки («восточной» или «западной» формы, либо и той, и другой). Однако особи *P. esculentus*, наследующие геном озёрной лягушки и содержащие мтДНК «восточной» формы, воспроизводятся за

счет прудовой лягушки и могут получить мтДНК озёрной лягушки лишь при «первичном» скрещивании, приведшем к формированию данной клональной линии.

Из этого следует, что наблюдаемая нами картина соответствия в распределении геномов у озёрной и съедобной лягушки может быть объяснена несколькими гипотезами. Во-первых, съедобная лягушка, имеющая мтДНК «восточной» формы и представляющая продолжительную по времени клональную линию, может происходить из других, предположим, западных территорий. Расселяясь, она должна была бы заселить именно те участки, в которых встречается озёрная лягушка «восточной» формы. Однако такое предположение маловероятно.

Во-вторых, данное обстоятельство может косвенно свидетельствовать в пользу того, что гибриды исконно появились в местах их отлова, а не пришли сюда из других мест. Статистически значимые различия между частотами встречаемости аллелей яДНК «восточной» формы у озёрной и съедобной лягушек нами найдены не были ($\chi^2 = 0.002$; $p = 0.964$), что частично подтверждает данное предположение.

Однако эта вторая гипотеза может быть отвергнута, если допустить, что обнаруженный ныне тип наследуемого генома в чреде поколений у части или у всех *P. esculentus* заменяется другим (по неизвестным в настоящее время причинам). Такой вариант событий, хотя и не подтверждается для изученных Л. Бергером (Berger, 1971) двух поколений *P. esculentus*, всё же не исключен, учитывая, что в настоящее время молекулярно-генетический механизм элиминации генома неизвестен, а для его объяснения могут быть применены эпигенетические механизмы наследования (Dedukh et al., 2015).

Генетическая характеристика «неклонального» гибрида. В предыдущей работе (Свинин и др., 2013) была отмечена гибридная самка, имевшая размер генома (15.61 пг), промежуточный между таковым у съедобной и озёрной лягушек. Молекулярно-генетический анализ данного экземпляра подтвердил, что это был гибрид (самка была гетерозиготной по ядерному маркеру), а также выявил у него «западный» тип мтДНК.

Необычный случай с данной самкой может объясняться тем, что у родительской гибридной особи произошло нарушение в клональном типе передачи генома. Поэтому в гаметах гибрида геном оказался смешанным. При скрещивании этого гибрида с озёрной лягушкой потомство получило геном, промежуточный по размеру между геномами *P. esculentus* и *P. ridibundus*. Внешний вид этой



Рис. 3. Возможное происхождение особи *P. esculentus*, имеющей увеличенное количество яДНК, и ее внешний вид: *а* – пяточный бугорок и первый палец задней конечности, *б* – вид особи сверху и снизу

особи соответствовал озёрной лягушке (независимое определение С. Н. Литвинчука и А. О. Свинина), что может быть связано с «эффектом дозы генов» (рис. 3).

Сопоставление вариантов яДНК и типа продуцируемых гамет у гибридной *P. esculentus*. В связи с наличием двух криптических форм озёрной лягушки остается открытым вопрос о том, принимает ли «восточная» форма участие в образовании полуклональных гибридов или же последние образуются только в результате скрещиваний с «западной» формой?

Известно, например, что лабораторные гибриды между озёрной лягушкой из Загреба в Хорватии (где нет *P. esculentus*), с одной стороны, и *P. lessonae*, с другой, дают стерильных гибридов (Berger et al., 1994). Однако гибриды между озёрной лягушкой, с одной стороны, и *P. shqipericus* или *P. epiroticus*, с другой, не размножаются полуклонально (Berger et al., 1994; Guerrini et al., 1997). Было высказано предположение о том, что «восточная» форма не образует полуклональных гибридов (Holsbeek et al., 2008, p. 5033).

В пользу того, что «восточная» форма может принимать участие в формировании полуклональных гибридов, косвенно свидетельствует обнаружение нами фертильного самца *P. esculentus* из Чермышево с «восточным» типом яДНК (табл. 4).

Нами было проведено сопоставление вариантов яДНК и типа наследуемого генома, определенного с помощью проточной ДНК-цитометрии у самцов и электрофореза у самок (см. табл. 4). Было обнаружено, что один самец из Чермышевского водохранилища (R-E-L система), у которого один из аллелей изученного маркера яДНК был специфичен для «восточной» формы озёрной лягушки (R/BL), продуцировал гаметы с гаплоидным геномом *P. lessonae*.

Таблица 4

Соотношение генотипа особей и типа продуцируемых гамет у *P. esculentus*

Пол	Генотип (мтДНК/яДНК)	Тип ПС	Геном гамет	<i>n</i>
♀♀	L/RL	Кугуван	<i>rid</i>	1
	R/RL	Кугуван	<i>rid</i>	1
		Чермышево, Цибикнур	<i>les + rid</i>	3
	B/RL	Чермышево	<i>les + rid</i>	1
♂♂	R/RL	Чермышево	<i>rid</i>	4
		Кугуван		1
		Шаптунга		1
	B/RL	Чермышево	<i>rid</i>	2
	L/RL	Кугуван	<i>rid</i>	8
		Медведево		1
		Кугуван	<i>les</i>	1
Ошламучаш		<i>les + rid</i>	1	
R/BL	Чермышево	<i>les</i>	1	

Примечание. R – гаплотипы мтДНК и аллели «западной» формы, B – «восточной»; *les* – гаметы с геномом *P. lessonae*, *rid* – *P. ridibundus*, *les + rid* – гаметы одной особи, часть из которых содержит геном *P. ridibundus*, а другая часть – *P. lessonae*.

Сравнивая его с другими фертильными самцами из Чермышево, можно было бы предположить, что у *P. esculentus* элиминацию генома прудовой лягушки вызывает наличие генома «западной» формы, тогда как при контакте с геномом прудовой лягушки происходит элиминация генома «восточной» формы.

Однако с помощью данной гипотезы невозможно объяснить существование «смешанных» гамет у четырех самок и одного самца (см. табл. 4), когда у одной особи одновременно продуцируются гаметы, часть из которых содержит *P. les-*

sonae-геном, а часть – геном *P. ridibundus* (Vinogradov et al., 1991; Dedukh et al., 2015).

Также нами найден один самец *P. esculentus* из Кугувана с яДНК «западной» формы, продуцирующий гаметы с геномом *P. lessonae* – факт, также не укладывающийся в данную гипотезу.

Популяционная система L-E-типа из Кугувана довольно хорошо изучена и за семь лет постоянного мониторинга в ней не обнаружена озёрная лягушка. Большинство фертильных особей ($n = 11$) из нее продуцировали гаметы с геномом *P. ridibundus*. И лишь один самец продуцировал гаметы с геномом *P. lessonae*. Данный случай может быть свидетельством миграции особей *P. esculentus* из соседней R-E-L системы в Цибикинуре, расположенной в пяти километрах от Кугувана. Однако этот факт также может косвенно свидетельствовать и в пользу того, что в черед поколений у гибридов тип наследуемого генома может меняться.

Благодарности

Авторы благодарны В. И. Казакову (Санкт-Петербург), Д. В. Дедуку (Санкт-Петербург) и П. А. Селезневу (Йошкар-Ола) за помощь в сборе материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 15-04-05068 и 15-29-02546).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Белимов Г. Т., Седалищев В. Т. 1980. Озерная лягушка (*Rana ridibunda*) (Amphibia, Anura) в водоемах Якутска // Вестн. зоологии. № 3. С. 74 – 75.

Борисовский А. Г., Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М. 2000. Морфометрическая характеристика зеленых лягушек (комплекс *Rana esculenta*) в Удмуртии // Вестн. Удмурт. ун-та. № 5. С. 70 – 75.

Боркин Л. Я., Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Цауне И. А. 1987. Полуклональное наследование в гибридогенном комплексе *Rana esculenta* : доказательство методом проточной ДНК-цитометрии // Докл. АН СССР. Т. 295, № 5. С. 1261 – 1264.

Бухалова Р. В., Велигура Е. М. 2007. Лягушка озерная *Rana ridibunda* (Pallas, 1771) в Паратунской долине // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей : материалы VII науч.-практ. конф. Петропавловск-Камчатский : Камчатпресс. С. 51 – 58.

Вершинин В. Л. 1990. О распространении озерной лягушки в городе Свердловске // Экология. № 2. С. 67 – 71.

Дуйсебаева Т. Н., Березовиков Н. Н., Брушко З. К., Кубыкин Р. А., Хромов В. А. 2005. Озерная лягушка

(*Rana ridibunda* Pallas 1771) в Казахстане : изменение ареала в XX столетии и современное распространение вида // Современная герпетология. Т. 3/4. С. 29 – 59.

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. гос. ун-та. Т. 18, № 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.

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 / Зоол. ин-т РАН. СПб. С. 86 – 89.

Замалетдинов Р. И., Павлов А. В., Закс М. М., Иванов А. Ю., 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.

Ильяшенко В. Ю., Шилин Н. И., Семенов Д. В., Бобров В. В., Мищенко А. Л., Волков С. В., Ильяшенко Е. И., Хляп Л. А., Рожнов В. В., Варшавский А. А., Поспелов И. Н. 2014. Каталог редких позвоночных животных России. М. : Т-во науч. изд. «КМК». 74 с.

Иванов А. Ю., Корзиков В. А., Алексеев С. К., Ермаков О. А. 2015. Молекулярно-генетическая характеристика озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* s. l. из Верхнего Поочья // Материалы чтений и науч. конф., посвящ. памяти проф. Андрея Григорьевича Банникова и 100-летию со дня рождения. М. : Сельскохозяйственные технологии. С. 228 – 232.

Лада Г. А., Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М. 2011. Типы популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) на территории Русской равнины // Вопросы герпетологии : материалы Четвертого съезда Герпетол. о-ва им. А. М. Никольского. СПб. : Русская коллекция. С. 142 – 148.

Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Боркин Л. Я., Скоринов 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.

Ляпков С. М. 2014. Озерная лягушка (*Pelophylax ridibundus*) в термальных водоемах Камчатки // Зоол. журн. Т. 93, № 12. С. 1427 – 1432.

Свинин А. О., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я., Розанов Ю. М. 2013. Распространение и типы попу-

ляционных систем зеленых лягушек рода *Pelophylax* Fitzinger, 1843 в Республике Марий Эл // Современная герпетология. Т. 13, вып. 3/4. С. 137 – 147.

Цауне И. А. 1987. Систематика и распространение гибридного комплекса *Rana esculenta* на территории Латвийской ССР : автореферат дис. ... канд. биол. наук. Л. 17 с.

Яковлев В. А. 1990. К экологии озерной лягушки на Алтае // Экология. № 1. С. 67 – 71.

Яковлев В. А., Малков Н. П. 1985. Новый элемент в фауне амфибий Алтая // Вопросы герпетологии : автореф. докл. 6-й Всесоюз. герпетол. конф. Л. : Наука. Ленингр. отд-ние. С. 244 – 245.

Berger L. 1968. Morphology of the F1 generation of various crosses within *Rana esculenta* complex // Acta Zoologica Cracoviensia. Vol. 13, № 13. P. 301 – 324.

Berger L. 1970. Some characteristics of crosses within *Rana esculenta* complex in postlarval development // Annales Zoologici. Vol. 27, № 17. P. 373 – 416.

Berger L. 1971. Viability, sex and morphology of F₂ generation within forms of *Rana esculenta* complex // Zoologica Poloniae. Vol. 21, № 4. P. 345 – 393.

Berger L., Uzzell T., Hotz H. 1994. Postzygotic reproductive isolation between Mendelian species of European water frogs // Zoologica Poloniae. Vol. 39, № 3/4. P. 209 – 242.

Blankenhorn H. J. 1973. Zum Stand der Forschung über die Verbreitung der Grünfrösche im Kt. Zürich // Revue suisse de Zoologie. Bd. 80, № 3. S. 655 – 662.

Borkin L. J., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Milto K. D. 2001. Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae) : evidence from DNA flow cytometry // Amphibia-Reptilia. Vol. 22, № 4. P. 387 – 396.

Borkin L. J., Litvinchuk S. N., Mannapova E. I., Pestov M. V., Rosanov J. M. 2002. The distribution of green frogs (*Rana esculenta* complex) in Nizhny Novgorod Province, central European Russia // Russ. J. of Herpetology. Vol. 9, № 3. P. 195 – 208.

Borkin L. J., Korshunov A. V., Lada G. A., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Shabanov D. A., Zinenko A. I. 2004. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in eastern Ukraine // Russ. J. of Herpetology. Vol. 11, № 3. P. 203 – 222.

Christiansen D. 2010. Genetic structure and dynamics of all-hybrid edible frog populations // Dissertation zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde (Dr. sc. nat.) vorgelegt der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Zürich. Zürich. 143 p.

Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J., Mazepa G., Saifitdinova A., Shabanov D., Krasikova A. 2015. Optional endoreplication and selective elimination of parental genomes during oogenesis in diploid and triploid hybrid European water frogs // PLoS ONE. 2015. Vol. 10, № 4. e0123304.

Dubey S., Leuenberger J., Perrin N. 2014. Multiple origins of invasive and 'native' water frogs (*Pelophy-*

lax spp.) in Switzerland // Biological J. of the Linnean Society. Vol. 112, iss. 3. P. 442 – 449.

Guerrini F., Bucci S., Ragghianti M., Mancino G., Hotz H., Uzzell T., Berger L. 1997. Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids // J. of Experimental Zoology. Vol. 279, № 2. P. 163 – 176.

Günther R. 1975. Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrösche, «*Rana esculenta*», L., in der DDR (Anura, Ranidae) // Mitteilungen aus dem zoologischen Museum in Berlin. Bd. 51, № 1. S. 145 – 158.

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., de Waard J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. Vol. 270. P. 313 – 321.

Holsbeek G., Mergeay J., Hotz H., Plötner J., Volckaert A. M., De Meester L. 2008. A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex : consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation // Molecular Ecology. Vol. 17. P. 5023 – 5035.

Leuenberger J., Gander A., Schmidt B. R., Perrin N. 2014. Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae* / *P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? Genetic evidence from a field study // Conservation Genetics. Vol. 15, iss. 4. P. 869 – 878.

Pagano A., Dubois A., Lesbarreres D., Lode T. 2003. Frog alien species : a way for genetic invasion? // Comptes Rendus Biologies. Vol. 326, Suppl. 1. P. 85 – 92.

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

Plötner J., Köhler F., Uzzell T., Beerli P., Schreiber R., Guex G. D., Hotz H. 2009. 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. Vol. 53. P. 784 – 791.

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, iss. 2. P. 261 – 283.

Sokal R. R., Rohlf J. F. 1981. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Second ed. New York : Freeman W. H. 859 p.

Tunner H. G. 1974. Die klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung. Bd. 12, № 4. S. 309 – 314.

Uzzell T., Berger L. 1975. Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta* // Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Vol. 127, iss. 2. P. 13 – 24.

Uzzell T., Günther R., Berger L. 1977. *Rana ridibunda* and *Rana esculenta* : a leaky hybridogenetic system (Amphibia, Salientia) // Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. Vol. 128, iss. 9. P. 147 – 171.

Uzzell T., Hotz H., Berger L. 1980. Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid : evidence from electrophoresis of individual oocytes // J. of Experimental Zoology. Vol. 214, iss. 3. P. 251 – 259.

Vinogradov A. E., Borkin L. J., Günther R., Rosanov J. M. 1990. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males : cytological evidence from DNA flow cytometry // Genome. Vol. 33, iss. 5. P. 619 – 627.

Vinogradov A. E., Borkin L. J., Günther R., Rosanov J. M. 1991. Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal // Hereditas. Vol. 114, iss. 3. P. 245 – 251.

DISTRIBUTION OF THE «EASTERN» AND «WESTERN» FORMS OF THE MARSH FROG, *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*, AND THEIR PARTICIPATION IN THE ORIGIN OF HEMICLONAL HYBRIDS, *P. ESCULENTUS* IN MARI EL REPUBLIC

**A. O. Svinin¹, A. Yu. Ivanov², M. M. Zaks², S. N. Litvinchuk³,
L. J. Borkin⁴, J. M. Rosanov³, and O. A. Ermakov²**

¹ Kazan (Volga Region) Federal University
18 Kremlevskaya Str., Kazan 420008, Russia
E-mail: ranaesc@gmail.com

² Penza State University
40 Krasnaya Str., Penza 440026, Russia
E-mail: oaermakov@list.ru

³ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences
4 Tikhoretsky pr., St. Petersburg 194064, Russia

E-mail: slitvinchuk@yahoo.com, rozanov@mail.cytspb.rssi.ru

⁴ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences
1 Universitetskaya nab., St. Petersburg 199034, Russia
E-mail: lacerta@zin.ru

Molecular-genetic analysis of green frogs (67 individuals of *Pelophylax ridibundus* and 63 ones of hybridogenic *P. esculentus*) from Mari El Republic (15 localities) and the Kirov Region (one locality) was performed by two (mitochondrial and nuclear) markers. Some part of the material (66 individuals) was studied by means of DNA flow cytometry. It is shown that in the green frogs living in the northern Middle Volga region, the genetic markers specific for the «western» (the Central European *P. ridibundus*) form are predominant. The alleles of the «eastern» form (the Anatolian *P. cf. bedriagae*) were considerably less frequent than in more southern territories of the Volga River basin. In *P. esculentus*, the mtDNA of all three types (from both forms of *P. ridibundus*, and from *P. lessonae*) were revealed. The alleles of the nuclear DNA characteristic for the «eastern» form were only found in two *P. esculentus* individuals from two localities. The relationships of the nuclear DNA genotypes and the types of gametes of the nuclear DNA genotypes and the types of gametes in hybrids are discussed.

Key words: green frogs, *Pelophylax esculentus* complex, cytochrome oxidase, serum albumin, DNA flow cytometry, distribution, Mari El.