

Распространение и гибридизация криптических видов зелёных жаб (*Bufo*) (*Bufo*) (Bufonidae, Amphibia) на территории Республики Дагестан

Д. В. Скоринов^{1✉}, Т. А. Ракицкая², А. Д. Аскендеров^{3,4},
Л. Ф. Мазанаева³, С. Н. Литвинчук^{1,3}

¹Институт цитологии РАН

Россия, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

²Национальный исследовательский университет ИТМО

Россия, 197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49, литер А

³Дагестанский государственный университет

Россия, 367000, г. Махачкала, ул. Магомеда Гаджиева, д. 43а

⁴Прикаспийский институт биологических ресурсов

Дагестанского федерального исследовательского центра РАН

Россия, 367000, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, д. 45

Информация о статье

Оригинальная статья

УДК 597.825

[https://doi.org/10.18500/1814-6090-](https://doi.org/10.18500/1814-6090-2024-24-1-2-20-29)

2024-24-1-2-20-29

EDN: OOOZRV

Поступила в редакцию 18.07.2023,

после доработки 26.08.2023,

принята 11.09.2023,

опубликована 28.06.2024

Аннотация. Распространение криптических видов зелёных жаб (*Bufo viridis* и *B. sitibundus*) в Республике Дагестан до сих пор недостаточно изучено. Авторами статьи были использованы ядерный (микросателлит *VM224*) и митохондриальный (фрагмент гена *CytB*) маркеры, характеризующиеся видоспецифичными аллелями и гаплотипами соответственно. Установлено, что в низменных районах на севере республики в популяциях жаб преобладают аллели *VM224*, характерные для *B. viridis*, а южнее в горной части и на Приморской низменности (побережье Каспия юго-восточнее Махачкалы) – характерные для *B. sitibundus*. В большинстве выборок присутствовали как гомозиготные, так и гетерозиготные генотипы. Распределение гаплотипов по *CytB* в республике заметно отличалось от такового по локусу *VM224*. Если сравнивать встречаемость аллелей *VM224* и гаплотипов *CytB* в изученных выборках, то связь между ними оказалась очень слабой. У многих особей ядерный маркер принадлежал одному, а митохондриальный – другому виду, указывая на широкое распространение здесь асимметричной интрогрессии митохондриальных геномов. Выявлена достоверная корреляция между высотой местонахождения и встречаемостью аллелей ядерного маркера *VM224*. В горных районах республики распространены преимущественно популяции *B. sitibundus*, а в низменных – гибридные популяции, в которых преобладание аллелей *B. viridis* характерно для наиболее северных популяций, населяющих сухостепные и полупустынные ландшафты.

Ключевые слова: *Bufo viridis*, *Bufo sitibundus*, Bufonidae, зона контакта ареалов, восточный Кавказ, мультиплексная ПЦР, микросателлиты

Образец для цитирования: Скоринов Д. В., Ракицкая Т. А., Аскендеров А. Д., Мазанаева Л. Ф., Литвинчук С. Н. 2024. Распространение и гибридизация криптических видов зелёных жаб (*Bufo*) (Bufonidae, Amphibia) на территории Республики Дагестан // Современная герпетология. Т. 24, вып. 1/2. С. 20 – 29. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2024-24-1-2-20-29>, EDN: OOOZRV

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

ВВЕДЕНИЕ

До недавнего времени считалось, что все зелёные жабы (род *Bufo* Rafinesque, 1815) относятся к одному виду, *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) (Банников и др., 1977; Кузьмин, 2012). Это связано с тем, что изучались в основном только внешние признаки (Borkin et al., 2000). Однако эти жабы характеризуются очень изменчивой внешней

морфологией и часто для точного определения их видовой принадлежности необходимо применять молекулярные и цитогенетические методы (Боркин и др., 2004). Более того, применение этих методов позволило установить, что род включает не один, а десять диплоидных и пять полиплоидных видов (Dufresnes et al., 2019). Многие из этих видов являются криптическими, т. е. их нельзя

✉ Для корреспонденции. Лаборатория стабильности хромосом и микроэволюции генома Института цитологии РАН.

ORCID и e-mail адреса: Скоринов Дмитрий Владимирович: <https://orcid.org/0000-0002-9916-2098>, skorinovd@yandex.ru; Ракицкая Татьяна Александровна: rta20002@gmail.com; Аскендеров Азим Даниялович: <https://orcid.org/0000-0002-6491-7091>, askenderov@mail.ru; Мазанаева Людмила Фейзулаевна: <https://orcid.org/0000-0002-8199-0936>, mazanaev@mail.ru; Литвинчук Спартак Николаевич: <https://orcid.org/0000-0001-7447-6691>, litvinchukspartak@yandex.ru.

идентифицировать при помощи стандартных морфологических методов.

В Дагестане зелёные жабы широко распространены, населяя всевозможные биотопы в полупустынных и сухостепных ландшафтах низменностей, а также горную часть (до 3300 м н.у.м.). Они довольно обычны и в урбанизированных ландшафтах, включая городские агломерации (Аскендеров, 2017). Изучение количества ядерной ДНК, изменчивости микросателлитов и аллозимов в популяциях зелёных жаб на территории этой республики показало, что здесь встречаются две формы – «восточная» («*variabilis*») и «западная», которые впоследствии были выделены в качестве отдельных видов, *B. sitibundus* (Pallas, 1771) и *B. viridis* соответственно (Литвинчук и др., 2006, 2008; Dufresnes et al., 2019). Наличие гаплотипов *B. sitibundus* в Дагестане было подтверждено также и при анализе митохондриальной ДНК (Stöck et al., 2006). Однако следует отметить, что таксономический статус *B. sitibundus* до сих пор остается спорным (вид или подвид) из-за недостаточно хорошо изученных особенностей гибридизации этого вида с его ближайшими родственниками, *B. viridis* и *B. perrini* Мазера, Litvinchuk, Jablonski, Dufresnes, 2019 (Литвинчук и др., 2006, 2008; Spreybroeck et al., 2020; Frost, 2023). Тем не менее, учитывая значительную филогенетическую дивергенцию, соответствующую временным рамкам видообразования у некоторых других видов палеарктических бесхвостых амфибий, *B. sitibundus* может рассматриваться в качестве самостоятельного вида (Stöck et al., 2006; Dufresnes et al., 2019; Dufresnes, Litvinchuk, 2022), что и принимается в рамках данной работы.

Во многих группах животных межвидовая гибридизация достаточно обычное явление (Dufresnes et al., 2021a). Не исключение и зелёные жабы, многие виды которых могут успешно гибридизировать на границах своих ареалов. Наиболее протяжённая гибридная зона в этом роде отмечена между *B. sitibundus* и *B. viridis*. Однако точное её местоположение до сих пор не установлено и поэтому требует дальнейших исследований (Литвинчук и др., 2006; Stöck et al., 2008). Связано это с тем, что оба вида являются криптическими и не могут быть точно идентифицированы при помощи стандартных морфологических методов. В ходе изучения размера генома и изменчивости микросателлитных локусов ранее было определено местоположение зоны контакта ареалов *B. viridis* и *B. sitibundus* в Поволжье (Файзулин и др., 2018) и западной Турции (Dufresnes et al., 2019, 2021b). Предварительные исследования вариабельности размера генома и микросател-

литной ДНК также позволили выявить приблизительное расположение зоны контакта этих двух видов на северном Кавказе (Литвинчук и др., 2008; Dufresnes et al., 2019). Однако детальное расположение границ ареалов этих двух видов в Республике Дагестан до сих пор остаётся недостаточным изученным.

Цель статьи – анализ особенностей распространения и гибридизации двух криптических видов зелёных жаб на территории Республики Дагестан.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В ходе нашего исследования было изучено 133 особи зелёных жаб из 21-й выборки, собранной в Республике Дагестан, и одной выборки с границы между республиками Калмыкия и Дагестан (табл. 1, рис. 1). Пробы брались из образцов крови и мышц. Для выделения ДНК из образцов крови был использован набор «Экспресс-ДНК-Био» («Алкор Био», Россия), а из образцов мышц – набор ДНК-Экстран-2 (Синтол, Россия).

Генетическая изменчивость в этих выборках была изучена при помощи микросателлита *BM224* и фрагмента митохондриального гена *CytB* (табл. 2). Микросателлит *BM224* (длина у зелёных жаб около 135 – 155 п.н.) представляет собой последовательность (TG)₅TA(TG)₅TA(TG)₂... (AG)₁₅ (Tikel et al., 2000). Ранее этот ядерный маркер уже использовался для идентификации таксономической принадлежности видов рода *Bufo* (Литвинчук и др., 2006). Представленный в данной статье анализ последовательностей полных геномов ряда видов бесхвостых амфибий, депонированных в Генбанке (XM_044295828, XM_056522180, XM_040354461, XM_041566518), показал, что данный микросателлит, вероятно, является фрагментом ядерного гена *ZFH4* (zinc finger homeobox 4), отвечающего за активацию ДНК-связывающего фактора транскрипции (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79776#gene-expression>). Предполагается, что он участвует в регуляции транскрипции РНК-полимеразы II. Как правило, у *B. viridis* амплифицируемый фрагмент микросателлита *BM224* имеет длину меньшую, чем 140 п.н., а у *B. sitibundus* – большую (см.: Литвинчук и др., 2006), что позволяет идентифицировать аллели, относящиеся к каждому из этих видов при разделении их методом вертикального гель-электрофореза в плотном (10 – 12%-ном) полиакриламидном геле.

При разработке праймеров на основе диагностического локуса митохондриальной ДНК (мтДНК) были проанализированы депонированные в GenBank 12 последовательностей фрагмента гена цитохрома *b* (*CytB*) *B. viridis* из Гер-

Таблица 1. Номера выборок, места сбора, координаты, высота и количество изученных особей
Table 1. Numbers for localities and their names, coordinates, altitude, and number of studied individuals

Выборка / Sampling	Место сбора / Locality	Координаты / Coordinates	Высота, м н.у.м. / Altitude, m a.s.l.	Кол-во изученных особей / Number of studied individuals
1	Южно-Сухокумск / Yuzhno-Sukhokumsk	44.68° N 45.62° E	16	16
2	Восточно-Сухокумск / Vostochno-Sukhokumsk	44.69° N 45.94° E	-2	12
3	Андратинский* / Andratinskiy*	44.95° N 46.42° E	-18	11
4	Каранагайский канал / Karanagay Channel	44.23° N 45.89° E	9	2
5	Ленинаул / Leninaul	44.20° N 46.02° E	0	5
6	Карасу / Karasu	44.08° N 45.90° E	25	5
7	Кочубей / Kochubey	44.38° N 46.55° E	-25	7
8	Тарумовка / Tarumovka	44.07° N 46.53° E	-13	7
9	Алекса́ндро-Невское / Alexandro-Nevscoe	43.92° N 46.56° E	-7	2
10	Кизляр / Kizlyar	48.83° N 46.70° E	-9	9
11	Борагангечув / Boragangechuv	43.31° N 46.43° E	69	2
12	Энди́рей / Endirey	43.20° N 46.66° E	211	3
13	Лени́нкент / Leninkent	42.97° N 47.34° E	153	11
14	Махачкала / Makhachkala	42.99° N 47.49° E	15	1
15	Кара́будахкент / Karabudakhkent	42.70° N 47.57° E	261	2
16	Озеро Папас / Lake Papas	42.33° N 48.05° E	-19	10
17	Тинди / Tindi	42.45° N 46.13° E	1615	7
18	Бежта / Bezhta	42.13° N 46.12° E	1770	3
19	Камилух / Kamilukh	41.92° N 46.63° E	2133	5
20	Джиных / Dzhinykh	41.67° N 47.05° E	1881	4
21	Курукал / Kurukal	41.44° N 47.69° E	1170	1
22	Куруш / Kurush	41.32° N 47.83° E	2183	8

Примечание. * Республика Калмыкия.
 Note. * Republic of Kalmykia.

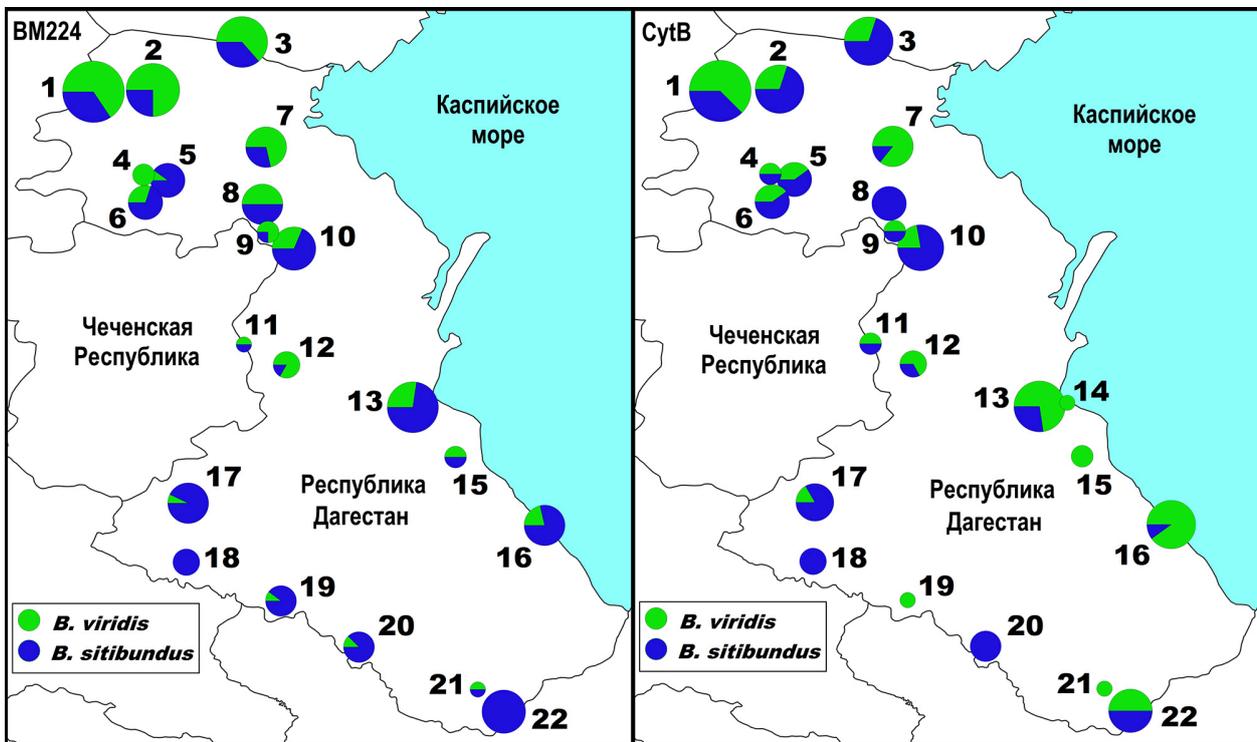


Рис. 1. Распределение аллелей ядерных (микросателлит *BM224*) и гаплотипов митохондриальных (фрагмент гена *CytB*) локусов в выборках зелёных жаб в Республике Дагестан. Нумерация мест сбора соответствует таковой в табл. 1. Диаметры круговых диаграмм соответствуют размеру выборок

Fig. 1. Distribution of nuclear (microsatellite *BM224*) and mitochondrial (*CytB* gene fragment) loci in samples of green toads from Dagestan. Numbers for localities are given in Table 1. Diameters of pie charts correspond to size of samples

Таблица 2. Праймеры, использованные при проведении ПЦР для идентификации *Bufo viridis* и *B. sitibundus*, примерная длина продуктов амплификации и их специфичность

Table 2. Primers used in PCR to identify *Bufo viridis* and *B. sitibundus*, approximate length of PCR products and their specificity

Праймер / Primer	Нуклеотидная последовательность / Sequence (5' – 3')	Длина ПЦР-продукта / PCR product length, bp	Видоспецифичность продукта / Specificity
BM224F	5'-GGGATCTGTGCAGATGGG-3'	–	Все виды / All species
BM224R	5'-GCTGATCTTGCACAATCTTTG-3'	135	<i>B. viridis</i>
--/--	--/--	145 – 155	<i>B. sitibundus</i>
CytB-dF	5'-TCACCAAACAGGGTCCTCAA-3'	–	Все виды / All species
BvirCytBR	5'-TCTTTGTAGGAGTAGTAAGCGT-3'	84	<i>B. viridis</i>
BsitCytBR	5'-AGCTAGAGGTCGGAATATAAGA-3'	364	<i>B. sitibundus</i>

мании (МК890049, МК890092, МК890095-7), *B. sitibundus* из Ирана и Турции, а также *B. viridis* с интрогрессивной мтДНК *B. sitibundus* из Дании (AB159263, KY352279, KY352286-7, KY352295, MT410958, NC_050665). Их анализ показал, что маркерные различия между этими двумя видами составляют 2.5% (12 из 471 нуклеотидных замен). Для идентификации данных видов с помощью мультиплексной ПЦР был разработан набор с одним общим прямым (*Cytb*-dF; позиции нуклеотидов 87-106 на фрагменте под номером МК890096) и двумя обратными видоспецифичными праймерами, имеющими приблизительно одинаковые температуры отжига (см. табл. 2). Для выявления гаплотипов *B. viridis* и *B. sitibundus* применяли обратные праймеры *BvirCytBR* (149-170) и *BsitCytBR* (429 – 450), что позволило получать продукты ПЦР длиной 84 п.н. и 364 п.н. соответственно (см. табл. 2).

Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала 50 – 100 нг ДНК исследуемой особи, 0.5 мкМ каждого праймера, 25 мкл 2X Taq М мастер-микс (горячий старт, зеленый; Алькор Био, Санкт-Петербург, Россия) и необходимое количество дистиллированной воды. При амплификации локуса *BM224* была использована программа: 95°C – 15 мин + (94°C – 105 с) + (94°C – 15 с, 57°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 56°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 55°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 54°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 53°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 52°C – 20 с, 72°C – 10 с) + (94°C – 15 с, 57°C – 20 с, 72°C – 10 с) × 27 + (72°C – 120 с), а при амплификации локуса *CytB*: 95°C – 15 мин + (94°C – 30 с, 62°C – 30 с, 72°C – 30 с) × 35, 72°C – 10 мин.

Продукты амплификации разделялись методом вертикального гель-электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. После проведения электрофореза гели с видоспецифичными фрагментами ДНК окрашивали бромистым этидием и визуализировали в ультрафиолетовом спектре трансиллюминатора (длина волны 365 нм).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На территории Республики Дагестан выявлены аллели и гаплотипы двух видов зелёных жаб (табл. 3, рис. 2). При этом по микросателлитному маркеру *BM224* 30 особей (23.8%) несли только аллели *B. viridis*, 49 (38.9%) – *B. sitibundus*, а 47 (37.4%) характеризовались гетерозиготными генотипами. Суммарно аллели *B. viridis* были выявлены у 76 особей (60.3%), а *B. sitibundus* – у 96 (76.2%).

По митохондриальному маркеру (*CytB*) у 52.9% жаб (65 особей) были выявлены гаплотипы *B. viridis*, а у 47.1% – *B. sitibundus* (58 особей; см. табл. 3). Среди изученных животных было выявлено 14 (12.1%) особей, имеющих как ядерные, так и митохондриальные маркеры, относящиеся только к *B. viridis*, и 26 (22.4%) – к *B. sitibundus*. Нужно отметить, что из всех изученных популяций только зелёные жабы из высокогорного селения Бежта (см. табл. 1, № 18) имели как ядерные, так и митохондриальные маркеры, относящиеся к одному виду (*B. sitibundus*). Во всех остальных выборках были выявлены аллели и гаплотипы сразу обоих видов как минимум по одному из маркеров (включая интрогрессивные комбинации, когда у особей *B. viridis* митохондриальная ДНК *B. sitibundus* и, наоборот, у *B. sitibundus* митохондриальный геном *B. viridis*). Из-за цито-ядерных несоответствий в популяциях получены по ядерным и митохондриальным маркерам различные картины распределения аллелей и гаплотипов (рис. 3; см. табл. 3), а связь между ними оказалась слабой ($R=0.21$, $df=1.19$, $p=0.354$).

Изучение микросателлитного маркера *BM224* выявило, что в низменной части северного Дагестана (№ 1 – 4, 7) преобладают особи с аллелями *B. viridis* (в среднем 75%), а в горной части и на низменностях южнее (№ 16 – 22) – *B. sitibundus* (в среднем 85%). По митохондриальному маркеру *CytB* такая четкая закономерность не прослеживается. Однако по обоим маркерам видно, что, как

Таблица 3. Доля (%) аллелей по микросателлиту *BM224*, встречаемость гаплотипов по фрагменту гена *CytB* и особей с различными комбинациями ядерных и митохондриальных маркеров в популяциях зелёных жаб Республики Дагестан.

Table 3. Allele frequency (%) of *BM224* microsatellite, haplotype frequency (%) of *CytB* gene fragment and occurrence of individuals with various combinations of nuclear and mitochondrial markers in green toad populations in Dagestan

№ / No.	Локалитет / Locality	<i>BM224</i>			<i>CytB</i>			<i>BM224 / CytB</i>						
		<i>n</i>	V	S	<i>n</i>	V	S	<i>n</i>	VV/V	VV/S	VS/V	VS/S	SS/V	SS/S
1	Южно-Сухокумск / Yuzhno-Sukhokumsk	16	65.7	34.3	16	62.5	37.5	16	18.8	18.8	43.8	12.5	0	6.3
2	Восточно-Сухокумск / Vostochno-Sukhokumsk	12	75.0	25.0	10	30.0	70.0	10	20.0	50.0	0	10.0	10.0	10.0
3	Андрагинский* / Andratinskiy	11	63.6	36.4	10	30.0	70.0	10	20.0	10.0	10.0	60.0	0	0
4	Каранагайский канал / Karanagay Channel	2	100	0	2	50.0	50.0	2	50.0	50.0	0	0	0	0
5	Ленинаул / Leninaul	5	10.0	90.0	5	40.0	60.0	5	0	0	20.0	0	20.0	60.0
6	Карасу / Karasu	5	30.0	70.0	5	40.0	60.0	5	0	20.0	20.0	0	20.0	40.0
7	Кочубей / Kochubey	7	71.4	28.6	7	85.7	14.3	7	42.7	0	57.1	0	0	0
8	Тарумовка / Tarumovka	7	50.0	50.0	5	0	100	5	0	20.0	0	40.0	0	40.0
9	Александро-Невское / Alexandro-Nevsкое	2	75.0	25.0	2	50.0	50.0	2	0	50.0	50.0	0	0	0
10	Кизляр / Kizlyar	8	31.3	68.7	9	22.2	77.8	8	12.5	12.5	0	12.5	62.5	0
11	Борагангечув / Boragancezuv	1	50.0	50.0	2	50.0	50.0	1	0	0	0	100	0	0
12	Эндирей / Endirey	3	83.4	16.6	3	66.7	33.3	3	67.0	0	0	33.0	0	0
13	Ленинкент / Leninkent	11	27.3	72.7	11	72.7	27.3	11	0	0	45.5	9.1	27.3	18.2
14	Махачкала / Makhachkala	—	—	—	1	100	0	—	—	—	—	—	—	—
15	Карабудахкент / Karabudakhkent	2	50	50	2	100	0	2	0	0	100	0	0	0
16	Озеро Папас / Lake Papas	7	21.4	78.6	10	90	10	7	0	0	42.9	0	42.9	14.3
17	Тинди / Tindi	7	7.1	92.9	6	16.7	83.3	6	0	0	0	16.7	16.7	66.7
18	Бежта / Bezhta	3	0	100	3	0	100	3	0	0	0	0	0	100
19	Камилух / Kamilukh	4	12.5	87.5	1	100	0	—	—	—	—	—	—	—
20	Джиньх / Dzhiniykh	4	12.5	87.5	4	0	100	4	0	0	0	25.0	0	75.0
21	Курукал / Kurukal	1	50.0	50.0	1	100	0	1	0	0	100	0	0	0
22	Куруш / Kurush	8	0	100	8	50.0	50.0	8	0	0	0	0	50.0	50.0
<i>B. viridis</i>		30	23.8	—	65	52.9	—	—	—	—	—	—	—	—
Гетерозиготы / Heterozygotes		47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>B. sitibundus</i>		49	—	38.9	58	—	47.1	—	—	—	—	—	—	—
Всего / Total		126	—	—	123	—	—	116	12.1	12.1	22.4	14.7	16.4	22.4

Примечание. № – номера выборок; *n* – количество изученных особей; V – аллели и гаплотипы, характерные для *Bufo viridis*, S – для *B. sitibundus*.

Note. No. is numbers for localities; *n* is number of studied individuals; V is alleles and haplotypes characteristic for *Bufo viridis*, and S for *B. sitibundus*.

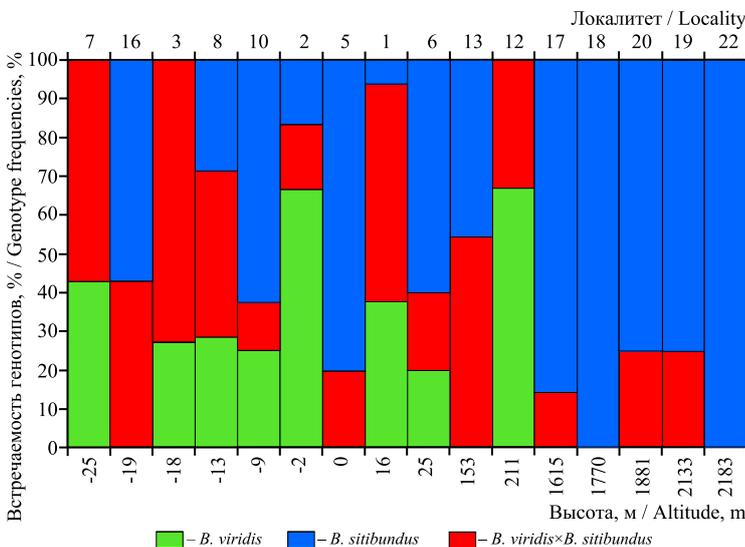


Рис. 2. Соотношение гомо- и гетерозиготных генотипов (*BM224*) в популяциях ($n \geq 3$) зелёных жаб Республики Дагестан. Выборки расположены слева направо по мере увеличения высоты места сбора. Нумерация локалитетов соответствует таковой в табл. 1

Fig. 2. Ratio of homo- and heterozygous genotypes (*BM224*) in populations ($n \geq 3$) of green toads in Dagestan. Samples are arranged from left to right as locality altitude increases. Numbers for localities are given in Table 1

правило, в юго-западной горной части республики в популяциях зелёных жаб больше особей с аллелями *B. sitibundus*, а в прибрежно-низменной – *B. viridis* (см. рис. 1).

Помимо этого, хорошо заметно (см. табл. 3), что по *BM224* в низменной части республики вместе с гетерозиготными генотипами зачастую встречаются гомозиготные генотипы с аллелями *B. viridis*, а в южной горной части – гомозиготные генотипы с аллелями *B. sitibundus* (см. рис. 2). Важно также отметить, что на севере Дагестана в некоторых популяциях (№ 1-2, 6, 8, 10) помимо гетерозиготных встречаются и гомозиготные генотипы с аллелями, характерными для обоих видов (см. табл. 3, рис. 2). Наибольшее количество гетерозиготных особей отмечено в прибрежно-равнинной части республики и, по мере продвижения в горы, процент гетерозиготных особей снижается. Чем меньше высота, тем больше аллелей *B. viridis* встречается в популяциях, и, наоборот, чем больше высота, тем чаще встречаются аллели *B. sitibundus* (см. рис. 2-3). Выявлена достоверная корреляция между высотой места сбора и встречаемостью аллелей (*B. viridis*: $R = 0.65$, $df = 1.20$, $p = 0.001$). А вот корреляции между встречаемостью митохондриальных гаплотипов и высотой не отмечено (*B. viridis*: $R = 0.14$, $df = 1.20$, $p = 0.543$).

Если говорить о картине распространения видов зелёных жаб в целом, полученной на основе распределения аллелей ядерного маркера *BM224*, то можно отметить, что в горной части Дагестана преимущественно встречаются «почти чистые» популяции *B. sitibundus*, а в низменных – популяции, несущие заметную долю гибридных генотипов (вероятно, гибридная зона). Граница распространения «чистых» популяций *B. viridis* находится северозападнее границ республики. Также важно отметить, что, несмотря на встречаемость гетерозиготных аллелей практически по всей территории Дагестана, основная часть зоны гибридизации между *B. viridis* и *B. sitibundus* расположена в северной части республики. Наличие аллелей *B. viridis* на юге, по-видимому, является лишь следствием интрогрессии генов и говорит о том, что они легко могут проникать в популяции, живущие вдоль всего побережья Каспийского моря.

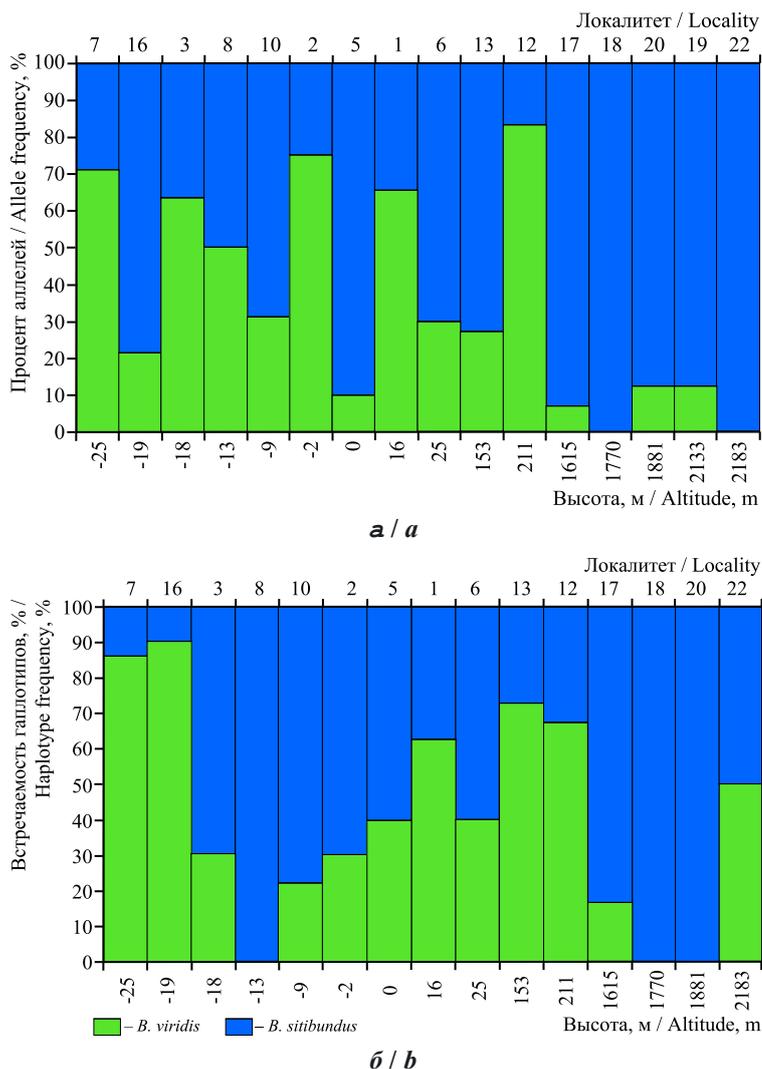


Рис. 3. Соотношение аллелей ядерного (*BM224*) (а) и гаплотипов митохондриального (*CytB*) (б) локусов в популяциях ($n \geq 3$) зелёных жаб в Республике Дагестан. Выборки расположены слева направо по мере увеличения высоты места сбора. Нумерация локалитетов соответствует таковой в табл. 1

Fig. 3. Ratio of nuclear (*BM224*) (a) and mitochondrial (*CytB*) (b) loci in localities ($n \geq 3$) of green toads in Dagestan. Samples are arranged from left to right as locality altitude increases. Numbers for localities are given in Table 1

На территории Дагестана зона гибридизации между *B. viridis* и *B. sitibundus*, где часто встречаются аллели обоих видов, простирается примерно на 250 км с севера на юг, что довольно много для того, чтобы считать ее «узкой парапатрической», как это ранее было выявлено на территории Поволжья (Файзулин и др., 2018). Зона гибридизации между этими видами с заметным цито-ядерным несоответствием была обнаружена и в западной Турции (Dufresnes et al., 2021b). Обычно такое явление объясняется срав-

нительно недавним (вероятно, после окончания плейстоценового периода) смещением географического положения гибридной зоны (см., например, Формозов, 2007; Höglund et al., 2022). Полагаем, что такая большая ее протяженность в Дагестане также может быть связана с влиянием постледниковых изменений границ ареалов этих видов под влиянием быстро меняющихся внешних условий после окончания плейстоцена, а также под влиянием антропогенного воздействия. Вероятно, популяции обоих видов начали всё более интенсивно распространяться по предгорным равнинам северо-восточного Кавказа, осваивая многочисленные артезианские скважины и ирригационные каналы, появившиеся в этих засушливых районах сравнительно недавно. При этом изначальная изоляция между *B. viridis* и *B. sitibundus* постепенно разрушается за счёт резкого увеличения потока генов между ними. Учитывая картину распределения аллелей и гаплотипов на исследованной территории, видимо, можно говорить о том, что в данном случае наблюдается широкая парапатрическая интрогрессивная гибридизация (Боркин, Литвинчук, 2013). Для лучшего понимания параметров и формы зоны гибридизации между этими двумя видами зелёных жаб необходимо продолжить её изучение, охватив всю территорию Северо-Кавказского региона, а также применив другие маркеры и методы биоклиматического моделирования для лучшего понимания влияния внешних факторов на изменение границ их ареалов в постледниковый период.

Благодарности

Мы искренне благодарны М. И. Матюшовой за помощь в обработке материала, В. И. Казакову и Ю. М. Розанову за предоставленные для нашей работы данные, а также К. М. Куниеву и Г. С. Джамирзоеву за предоставленную возможность сбора полевого материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аскендеров А. Д. 2017. Земноводные Дагестана: распространение, экология, охрана : дис. ... канд. биол. наук. Тольятти. 223 с.
- Банников А. Г., Даревский И. С., Ищенко В. Г., Рустамов А. К., Щербак Н. Н. 1977. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М. : Просвещение. 414 с.
- Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н. 2013. Гибридизация, видообразование и систематика животных // Труды Зоологического института РАН. Т. 317, приложение № 2. С. 83 – 139.
- Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Скоринов Д. В. 2004. О критических видах (на примере амфибий) // Зоологический журнал. Т. 83, вып. 8. С. 936 – 960.
- Кузьмин С. Л. 2012. Земноводные бывшего СССР. М. : Т-во науч. изд. КМК. 370 с.
- Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Усманова Н. М., Боркин Л. Я., Мазанаева Л. Ф., Казаков В. И. 2006. Изменчивость микросателлитов *BM224* и *BCAL7* в популяциях зелёных жаб (*Bufo viridis* complex), различающихся по размеру генома и плоидности // Цитология. Т. 48, вып. 4. С. 306 – 319.
- 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 Герпетологического общества им. А. М. Никольского. СПб. : Зоологический институт РАН. С. 247 – 257.
- Файзуллин А. И., Свинин А. О., Ручин А. Б., Скоринов Д. В., Боркин Л. Я., Розанов Ю. М., Кузовенко А. Е., Литвинчук С. Н. 2018. Распространение и зона контактов в Поволжье двух зелёных жаб комплекса *Bufotes viridis* (Anura: Bufonadie), различающихся по размеру генома // Современная герпетология Т. 18, вып. 1/2. С. 35 – 45. <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2018-18-1-2-35-45>
- Формозов Н. А. 2007. Интрогрессия чужеродных митотипов как следствие гипотезы «передового края» Годфрея Хьюитта: влияние гетерогаметности самцов или самок и соотношения полов в расселяющихся популяциях // Современные проблемы биологической эволюции : материалы конференции к 100-летию Государственного Дарвинского музея. М. : Государственный Дарвинский музей. С. 155 – 157.
- Borkin L. J., Rosanov J. M., Litvinchuk S. N. 2000. Nuclear DNA content in some green toads (*Bufo viridis* complex) of Turkey and Iran // Russian Journal of Herpetology. Vol. 8, № 3. P. 171 – 180.
- Dufresnes C., Litvinchuk S. N. 2022. Diversity, distribution and molecular species delimitation in frogs and toads from the Eastern Palaearctic // Zoological Journal of the Linnean Society. Vol. 195, iss. 3. P. 695 – 760. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab083>
- Dufresnes C., Mazepa G., Jablonski D., Oliveira R. C., Wenseleers T., Shabanov D. A., Auer M., Ernst R., Koch C., Ramirez-Chaves H. E., Mulder K. P., Simonov E., Tiutenko A., Kryvokhyzha D., Wennekes P. L., Zinenko O. I., Korshunov O. V., Al-Johany A. M., Peregontsev E.A., Masroor R., Betto-Colliard C., Denoël M., Borkin L. J., Skarinov D. V., Pasynkova R. A., Mazanaeva L. F., Rosanov J. M., Dubey S., Litvinchuk S. 2019. Fifteen shades of green: The evolution of *Bufotes* toads revisited // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 141. Article number 106615. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106615>

- Dufresnes C., Brelsford A., Jeffries D. L., Mazeпа G., Suchan T., Canestrelli D., Niecieza A., Fumagalli L., Dubey S., Martínez-Solano I., Litvinchuk S. N., Vences M., Perrin N., Crochet P.-A. 2021a. Mass of genes rather than master genes underlie the genomic architecture of amphibian speciation // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Vol. 118, № 36. Article number e2103963118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103963118>
- Dufresnes C., Probonas N. M., Strachinis I. 2021b. A reassessment of the diversity of green toads (*Bufo*) in the circum-Aegean region // Integrative Zoology. Vol. 16, iss. 3. P. 420 – 428. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12494>
- Frost D. R. 2023. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.2. New York: American Museum of Natural History. URL: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (дата обращения: 30.06.2023).
- Höglund J., Bolender L., Cortazar-Chinarro M., Meurling S., Laurila A., Hermaniuk A., Dufresnes C. 2022. Low neutral and immunogenetic diversity in northern fringe populations of the green toad *Bufo viridis*: Implications for conservation // Conservation Genetics. Vol. 23, iss. 1. P. 139 – 149. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01407-5>
- Speybroeck J., Beukema W., Dufresnes C., Fritz U., Jablonski D., Lymberakis P., Martínez-Solano I., Razzetti E., Vamberger M., Vences M., Vörös J., Crochet P.-A. 2020. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica // Amphibia – Reptilia. Vol. 41, iss. 2. P. 139 – 189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>
- Stöck M., Moritz C., Hickerson M., Frynta D., Dujsbayeva T., Eremchenko V., Macey J. R., Papenfuss T. J., Wake D. B. 2006. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genome plasticity // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 41, iss. 3. P. 663 – 689. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.026>
- Stöck M., Roth P., Podloucky R., Grossenbacher K. 2008. Wechselkröten – unter Berücksichtigung von *Bufo viridis viridis* Laurenti, 1768; *Bufo variabilis* Pallas, 1769; *Bufo boulengeri* Lataste, 1879; *Bufo balearicus* Böttger, 1880 und *Bufo siculus* Stöck, Sicilia, Belfiore, Lo Brutto, Lo Valvo und Arculeo, 2008 // Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas. Froschlurche II. Bd. 5. Wiesbaden : AULA-Verlag. S. 413 – 498.
- Tikel D., Paetkau D., Cortinas M. N., Leblois R., Moritz C., Estoup A. 2000. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the invasive toad species *Bufo marinus* // Molecular Ecology. Vol. 9, iss. 11. P. 1927 – 1929. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01074-6.x>

Hybridization and distribution of cryptic species of green toads (*Bufo*) (Bufonidae, Amphibia) in Republic of Dagestan (Russia)

D. V. Skorinov^{1✉}, T. A. Rakitskaya², A. D. Askenderov^{3,4},
L. F. Mazanaeva³, S. N. Litvinchuk^{1,3}

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences
4 Tikhoretsky Prospekt, St. Petersburg 194064, Russia

² National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics
liter A, 49 Kronverksky Prospekt, St. Petersburg 197101, Russia

³ Dagestan State University
43a Gadzhiev St., Makhachkala 367000, Russia

⁴ Caspian Institute of Biological Resources of the Dagestan Federal Research Center, Russian Academy of Sciences
45 Gadzhieva St., Makhachkala 367000, Dagestan, Russia

Article info

Original Article

<https://doi.org/10.18500/1814-6090-2024-24-1-2-20-29>
EDN: OOOZRV

Received July 18, 2023,
revised August 26, 2023,
accepted September 11, 2023,
published June 28, 2024

Abstract. Distribution of cryptic species of green toads (*Bufo viridis* and *B. sitibundus*) in Dagestan still understudied. We used the nuclear (microsatellite *BM224*) and mitochondrial (fragment of the *CytB* gene) markers characterized by species-specific alleles and haplotypes, respectively. Alleles of *B. viridis* predominated in toad populations in the plains in the north of the republic, while *B. sitibundus* alleles were more numerous in more southern mountainous and coastal (the coast of the Caspian Sea southeast of Makhachkala) regions. Most samples contained both homozygous and heterozygous genotypes. The distribution of haplotypes for the *CytB* gene in the republic differed markedly from that for the *BM224* microsatellite. If we compare the occurrence of *BM224* alleles and *CytB* haplotypes in studied populations, the relationship between them turned out to be very weak. In many individuals, the nuclear marker belonged to one species, while the mitochondrial marker belonged to another species, indicating the widespread asymmetric introgression of mitochondrial genomes here. We found a significant correlation between the altitude of location and the occurrence of *BM224* alleles. In mountainous regions of the republic, populations of *B. sitibundus* were predominantly distributed, while in lowland regions hybrid populations were revealed, in which the predominance of *B. viridis* alleles was typical for the most northern populations inhabiting dry steppe and semi-desert landscapes.

Keywords: *Bufo viridis*, *Bufo sitibundus*, Bufonidae, interspecies contact zone, Eastern Caucasus, multiplex PCR, microsatellites

For citation: Skorinov D. V., Rakitskaya T. A., Askenderov A. D., Mazanaeva L. F., Litvinchuk S. N. Hybridization and distribution of cryptic species of green toads (*Bufo*) (Bufonidae, Amphibia) in Republic of Dagestan (Russia). *Current Studies in Herpetology*, 2024, vol. 24, iss. 1–2, pp. 20–29 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2024-24-1-2-20-29>, EDN: OOOZRV

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

REFERENCES

- Askenderov A. D. *Amphibians of Dagestan: Distribution, Ecology, Conservation*. Diss. Cand. Sci. (Biol.). Togliatti, 2017. 223 p. (in Russian).
- Bannikov A. G., Darevsky I. S., Ishchenko V. G., Rustamov A. K., Shcherbak N. N. *Opredelitel' zemnovodnykh i presmykayushchikhsya fauny SSSR* [A Guide of Amphibians and Reptiles of Fauna of USSR]. Moscow, Prosveshchenie, 1977. 415 p. (in Russian).
- Borkin L. J., Litvinchuk S. N. Animal Hybridization, Speciation and Systematics. *Proceedings of the Zoo-*

logical Institute RAS, 2013, vol. 317, suppl. 2, pp. 83–139 (in Russian).

Borkin L. J., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Skorinov D. V. On cryptic species (from the example of amphibians). *Zoologicheskii zhurnal*, 2004, vol. 83, iss. 8, pp. 936–960 (in Russian).

Kuzmin S. L. *Amphibians of the Former USSR*. Moscow, KMK Scientific Press Ltd, 2012. 370 p. (in Russian).

Litvinchuk S. N., Rosanov Yu. M., Usmanova N. M., Borkin L. Ja., Mazanaeva L. F., Kazakov V. I. Variation

✉ Corresponding author. Laboratory of Chromosome Stability and Genome Microevolution of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Russia.

ORCID and e-mail addresses: Dmitriy V. Skorinov: <https://orcid.org/0000-0002-9916-2098>, skorinovd@yandex.ru; Tatyana A. Rakitskaya: rta20002@gmail.com; Azim D. Askenderov: <https://orcid.org/0000-0002-6491-7091>, askenderov@mail.ru; Lyudmila F. Mazanaeva: <https://orcid.org/0000-0002-8199-0936>, mazanaev@mail.ru; Spartak N. Litvinchuk: <https://orcid.org/0000-0001-7447-6691>, litvinchukspartak@yandex.ru.

of microsatellites *BM224* and *BCAL7* in populations of green toads (*Bufo viridis* complex) with various nuclear DNA content and ploidy. *Tsitologiya*, 2006, vol. 48, iss. 4, pp. 306–319 (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. *Proceedings of the 3th Meeting of the Nikolsky Herpetological Society "The Problems of Herpetology"*. Saint Petersburg, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences Publ., 2008, pp. 247–257 (in Russian).

Faizulin A. I., Svinin A. O., Ruchin A. B., Skorinov D. V., Borkin L. J., Rosanov Yu. M., Kuzovenko A. E., Litvichuk S. N. Distribution and contact zone of two forms of the green toad from the *Bufo viridis* complex (Anura, Amphibia), differing in genome size, in the Volga Region. *Current Studies in Herpetology*, 2018, vol. 18, iss. 1–2, pp. 35–45 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1814-6090-2018-18-1-2-35-45>

Formozow N. A. Introgression of alien mitotypes as a consequence of Godfrey Hewitt's leading edge hypothesis: Influence of male or female heterogamety and sex ratio in dispersing populations. In: *Modern Problems of Biological Evolution: Conference materials for the 100th anniversary of the State Darwin Museum*. Moscow, State Darwin Museum Publ., 2007. pp. 155–157 (in Russian).

Borkin L. J., Rosanov J. M., Litvinchuk S. N. Nuclear DNA content in some green toads (*Bufo viridis* complex) of Turkey and Iran. *Russian Journal of Herpetology*, 2000, vol. 8, no. 3, pp. 171–180.

Dufresnes C., Litvinchuk S. N. Diversity, distribution and molecular species delimitation in frogs and toads from the Eastern Palaearctic. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2022, vol. 195, iss. 3, pp. 695–760. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab083>

Dufresnes C., Mazepa G., Jablonski D., Oliveira R. C., Wenseleers T., Shabanov D. A., Auer M., Ernst R., Koch C., Ramirez-Chaves H. E., Mulder K. P., Simonov E., Tiutenko A., Kryvokhyzha D., Wenekes P. L., Zinenko O. I., Korshunov O. V., Al-Johany A. M., Peregontsev E.A., Masroor R., Betto-Colliard C., Denoël M., Borkin L. J., Skorinov D. V., Pasynkova R. A., Mazanaeva L. F., Rosanov J. M., Dubey S., Litvinchuk S. Fifteen shades of green: The evolution of *Bufo* toads revisited. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, vol. 141, article no. 106615. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106615>

Dufresnes C., Brelsford A., Jeffries D. L., Mazepa G., Suchan T., Canestrelli D., Niecieza A., Fumagalli L., Dubey S., Martínez-Solano I., Litvinchuk S. N., Vences M., Perrin N., Crochet P.-A. Mass of genes rather

than master genes underlie the genomic architecture of amphibian speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2021a, vol. 118, no. 36, article no. e2103963118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103963118>.

Dufresnes C., Probonas N. M., Strachinis I. A re-assessment of the diversity of green toads (*Bufo*) in the circum-Aegean region. *Integrative Zoology*, 2021b, vol. 16, iss. 3, pp. 420–428. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12494>

Frost D. R. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 6.2. New York, American Museum of Natural History, 2023. Available at: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (accessed 30 June, 2023).

Höglund J., Bolender L., Cortazar-Chinarro M., Meurling S., Laurila A., Hermaniuk A., Dufresnes C. Low neutral and immunogenetic diversity in northern fringe populations of the green toad *Bufo viridis*: Implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2022, vol. 23, iss. 1, pp. 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01407-5>

Speybroeck J., Beukema W., Dufresnes C., Fritz U., Jablonski D., Lymberakis P., Martínez-Solano Í., Razzetti E., Vamberger M., Vences M., Vörös J., Crochet P.-A. Species list of the European herpetofauna – 2020 update by the Taxonomic Committee of the Societas Europaea Herpetologica. *Amphibia – Reptilia*, 2020, vol. 41, iss. 2, pp. 139–189. <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10010>

Stöck M., Moritz C., Hickerson M., Frynta D., Dujsbayeva T., Eremchenko V., Macey J. R., Papenfuss T. J., Wake D. B. Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genome plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, vol. 41, iss. 3, pp. 663–689. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.026>

Stöck M., Roth P., Podloucky R., Grossenbacher K. Wechselkröten – unter Berücksichtigung von *Bufo viridis* Laurenti, 1768; *Bufo variabilis* Pallas, 1769; *Bufo boulengeri* Lataste, 1879; *Bufo balearicus* Böttger, 1880 und *Bufo siculus* Stöck, Sicilia, Belfiore, Lo Brutto, Lo Valvo und Arculeo, 2008. In: *Handbuch der Amphibien und Reptilien Europas. Froschlurche II. Bd. 5*. Wiesbaden, AULA-Verlag, 2008, S. 413–498.

Tikel D., Paetkau D., Cortinas M. N., Leblois R., Moritz C., Estoup A. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the invasive toad species *Bufo marinus*. *Molecular Ecology*, 2000, vol. 9, iss. 11, pp. 1927–1929. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01074-6.x>