

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЧЕСНОЧНИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ *PELOBATES FUSCUS* (LAURENTI, 1768) ДОЛИНЫ р. МЕДВЕДИЦА (САРАТОВСКАЯ ОБЛАСТЬ) ПО УЧАСТКУ ГЕНА мтДНК – *CytB*

А. В. Полуконова¹, А. Г. Демин¹, Н. В. Полуконова²,
М. В. Ермохин¹, В. Г. Табачишин³

¹ Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского
Россия, 410012, Саратов, Астраханская, 83

² Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского
Россия, 410012, Саратов, Б. Казачья, 112

³ Саратовский филиал Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
Россия, 410028, Саратов, Рабочая, 24
E-mail: annypol@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.11.2012 г.

Сравнивали участок гена мтДНК – *CytB* чесночницы обыкновенной (*Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768)) из двух локальных популяций (озёра Садок и Кругленькое в долине р. Медведица в Саратовской области). Все определенные гаплотипы *P. fuscus* относятся к восточной форме этого вида. Из семи выявленных гаплотипов один был известен ранее (Е9), а шесть – обнаружены впервые и обозначены как Е12 – Е17. Уникальные гаплотипы *P. fuscus* из популяции оз. Кругленькое (Е15, Е16 и Е17) отличаются значительно большей удаленностью как от всех ранее известных гаплотипов восточной формы, так и от новых гаплотипов из популяции оз. Садок. Совокупность проанализированных гаплотипов объединяется в три кластера: первый кластер представлен новыми гаплотипами Е15 и Е17, второй – новыми гаплотипами Е12 и Е13, а третий – объединяет как уже известные гаплотипы Е1 – Е7, Е9 – Е11, так и новые – Е14 и Е16.

Ключевые слова: *Pelobates fuscus*, гаплотипы, Саратовская область.

ВВЕДЕНИЕ

Чесночница обыкновенная (*Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768)) – широко распространенный вид бесхвостых амфибий, достигающий высокой численности в долинах рек (Ермохин, Табачишин, 2010, 2011 а, б). Долгое время этот вид считался морфологически консервативным и мономорфным. Однако после привлечения к исследованию его генетической структуры новых подходов анализа (проточной ДНК-цитометрии, электрофореза белков, секвенирования гена мтДНК – *CytB*) стало очевидно, что вид не только полиморфен, но и, по-видимому, может оказаться политипическим, в настоящее время включающим, по крайней мере, две формы – западную и восточную (Халтурин и др., 2003; Боркин и др., 2001; Borkin et al., 2001; Crottini et al., 2007). В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что в случае с *P. fuscus* имеет место криптическое видообразование, приводящее к возникновению внешне практически неразличимых, но генетически различных видов (Халтурин и др., 2003).

В ходе молекулярно-биологических исследований различных групп животных, в том числе бесхвостых амфибий, анализ гаплотипов таких генов мтДНК, как COI, COII, *CytB*, позволил достоверно установить внутривидовую и видовую принадлежность, а также оценить генетическое разнообразие популяций (Полуконова и др., 2009; Демин и др., 2011; Полуконова и др., 2013; Crottini et al., 2007; Cranston et al., 2010). К настоящему времени получены данные по гаплотипам гена мтДНК – *CytB* для 61 локальной популяции *P. fuscus* (Crottini et al., 2007). Однако популяции *P. fuscus* в Саратовской области до настоящего времени изучены недостаточно.

Цель настоящего исследования – на основе анализа участка гена мтДНК – *CytB* оценить генетическое разнообразие гаплотипов *P. fuscus* на неисследованной ранее территории, а также установить, к какой внутривидовой форме (западной или восточной) относятся гаплотипы особей этого вида, нерестящихся в озёрах Садок и Кругленькое долины р. Медведица (Саратовская область).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы особи чесночницы обыкновенной – *Pelobates fuscus*, собранные в 2012 г. в озёрах Садок и Кругленькое в долине р. Медведица Лысогорского района Саратовской области (табл. 1). Всего было исследовано 13 особей. Материалом для выделения ДНК послужила печень чесночниц, фиксированная в 95%-ном этиловом спирте.

Таблица 1
Материал и места сбора

№ п/п	Популяция	Время сбора	Обозначение сиквенса
1	Саратовская обл., оз. Садок	07.2012 г.	S2, S3, S8
		04.2012 г.	S9, S11
2	Саратовская обл., оз. Кругленькое	04.2012 г.	K1, K13, K14, K16
		07.2012 г.	K4, K5, K6, K7

Определена последовательность нуклеотидов (п. н.) на участке 14676 – 15378 п. н. гена мтДНК – *CytB* (Gissi et al., 2008). В работе также использовано 24 нуклеотидных последовательностей гена *CytB*, относящихся к восточной форме *P. fuscus*, депонированные в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), каталожные номера которых приведены в табл. 2.

Выделение тотальной ДНК проводилось набором Diatomtm DNA Prep 100 «Изоген», амплификация гена *CytB* – набором GenePak[@] PCR Core «Изоген» на термоциклере «Терцик». ПЦР-амплификация: структура праймеров для амплификации гена *CytB*: L15162 (light chain; 5'-GCAAGCTTCTACCATGAGGACAAATATC-3') (Taberlet, Bouvet, 1992) и H15915 (heavy chain; 5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC-3'). Условия ПЦР: I. 94° – 1'; II. 5 циклов: а) 94° – 1', б) 45° – 1.5', с) 72° – 1.5'; III. 35 циклов: а) 94° – 1', б) 50° – 1.5', с) 72° – 1'; IV. 72° – 5'.

Детекция ПЦР-продуктов проводилась с помощью горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. В качестве буфера использовался стандартный трис-ацетатный буфер. Для элюции ПЦР-продуктов из геля применялся набор Diatomtm DNA Elution «Изоген». Определение первичной нуклеотидной последовательности генов проводилось на базе ЗАО ЕВРОГЕН (г. Москва) на секвенаторе Backman 2000.

Для коррекции полученных последовательностей использовалась программа ChromasPro, множественное выравнивание проводилось в ClustalW, филогенетические построения

методом Minimum Evolution и анализ генетических дистанций выполнялись в программе Mega5. Генетические дистанции рассчитывались методом Maximum Composite Likelihood. При построении дендрограммы в качестве внешней группы выбраны сиквенсы западной формы *P. fuscus* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Все полученные сиквенсы гена мтДНК – *CytB* *P. fuscus* из двух исследованных саратовских популяций свидетельствовали об их принадлежности гаплотипам восточной формы этого вида. Анализ нуклеотидных последовательностей *CytB* на основе *p*-дистанций позволил провести их распределение по гаплотипам (см. табл. 2).

Таблица 2
Соответствие гаплотипов восточной формы *P. fuscus* сиквенсам

Гаплотип	Число исследованных популяций с данным гаплотипом	Accession № GenBank или сиквенс	Источник
E1	12	EF133842	Crottini et al., 2007
E2	1	EF133843	
E3	1	EF133844	
E4	2	EF133845	
E5	1	EF133846	
E6	1	EF133847	
E7	1	EF133848	
E8	3	EF133849	
E9	4	EF133850	Crottini et al., 2007
		K1, K4, K5, K6, S2, S11	Собственные данные
E10	1	EF133851	Crottini et al., 2007
E11	1	EF133852	
E12*	1	S3	Собственные данные
E13*	2	K7	
		S8	
E14*	1	S9	
E15*	1	K13	
E16*	1	K14	
E17*	1	K16	

* Обозначены впервые описанные гаплотипы.

К одному и тому же описанному ранее гаплотипу E9 (Crottini et al., 2007), наряду с н. п. EF133850, относятся и отсеквенированные нами н. п. чесночниц из оз. Кругленькое (K1, K4, K5, K6) и оз. Садок (S2, S11), поскольку между ними не выявлено ни одной нуклеотидной замены.

Другие же обнаруженные нами гаплотипы оказались новыми для восточной формы *P. fuscus*: E12 – E17 (см. табл. 2).

На основе анализа нуклеотидной последовательности *CytB* *P. fuscus* методом минимальной эволюции построена дендрограмма, объединяющая как известные ранее гаплотипы восточной формы, так и впервые обнаруженные в популяциях этого вида на территории Саратовской области (рисунок). Анализ структуры дендрограммы показал присутствие трёх четких кластеров. Первый кластер включает сиквенсы *P. fuscus* из оз. Кругленькое (K13 и K16), представляющие собой два новых для вида гаплотипа (E15 и E17). Второй кластер содержит сиквенсы популяций *P. fuscus* из оз. Кругленькое (K7) и оз. Садок (S3 и S8), относящиеся к новым для вида гаплотипам (E12 и E13). Третий кластер объединяет сиквенсы из GenBank (EF133842, EF133843, EF133844, EF133845, EF133846, EF133847, EF133848, EF133850, EF133851, EF133852) как уже известные для вида гаплотипы (E1 – E11), так и новые, из популяции из озёр Кругленькое (K1, K4, K5, K6, K14) и Садок (S2, S9, S11), часть из которых относится к новым для вида гаплотипам – E14 и E16 (см. рисунок).

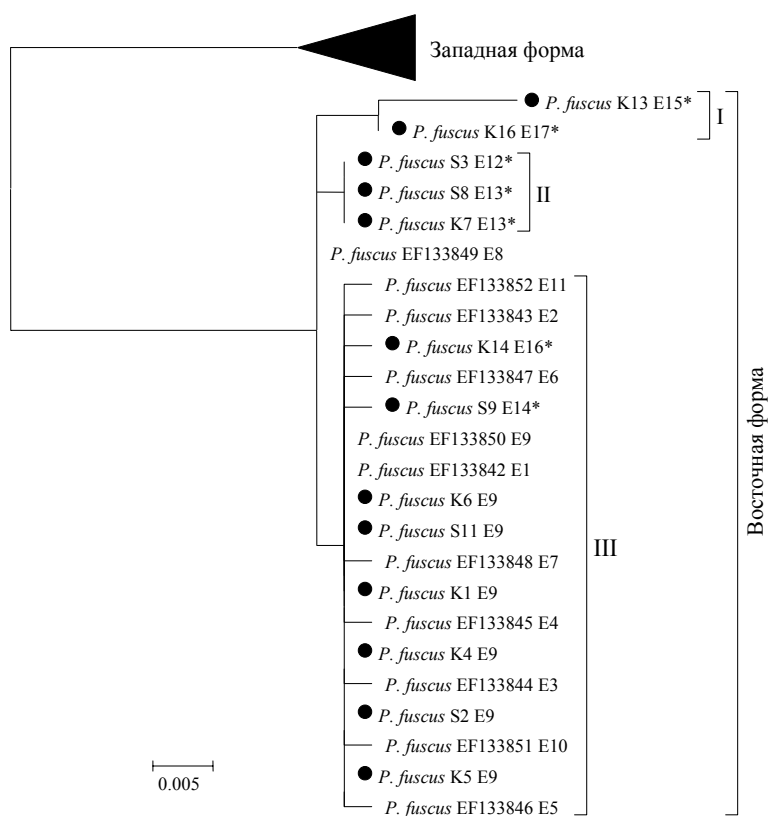
Разнообразие гаплотипов в Саратовских популяциях *P. fuscus* несколько выше в локальной популяции, нерестящейся в оз. Садок – из четырех проанализированных сиквенсов обнаружено три гаплотипа (0.75), по сравнению с оз. Кругленькое, в котором из девяти сиквенсов были выявлены шесть гаплотипов (0.67).

Гаплотип E1, по-видимому, относится к гаплотипам-основателям, поскольку был отмечен ранее в 12 географически разобщенных популяциях *P. fuscus* (Crottini et al., 2007). Такой гаплотип, как E9, по-видимому, наиболее близок к гаплотипам-основателям, поскольку встречен и в других популяциях (см. табл. 2). В то время как новые гаплотипы (E12 – E17) встречены пока только на территории Саратовской области и, очевидно, образовались позднее. В оз. Садок из четырёх гаплотипов *P. fuscus* два были встречены также в популяции оз. Кругленькое (E9 и E13), а другие два (E12, E14) были уникальными. Из пяти выявленных

гаплотипов *P. fuscus* в популяции оз. Кругленькое два оказались общими с гаплотипами оз. Садок, а остальные три – уникальными (E15 – E17). Учитывая биологические особенности *P. fuscus*, заключающиеся в репродуктивном консерватизме (нерест половозрелых особей происходит только в том водоёме, в котором они проходили личиночное развитие (Hels, 2002), можно предположить, что уникальные гаплотипы, очевидно, более молодые и возникли после заселения этими амфибиями исследуемых водоёмов.

Новые для восточной формы *P. fuscus* гаплотипы, обнаруженные в Саратовской области, в разной степени отличались от ранее известных. Так, по значениям *p*-дистанции наиболее близким к гаплотипу E14 из популяции оз. Садок следует считать ранее известный E9 (0.001); к гаплотипу E12 – только новый гаплотип E13 (0.004); к E13 наиболее близок E9 (0.003). Гаплотипы E12 и E13 наиболее близки и образуют единый кластер II (см. рисунок).

Уникальные гаплотипы *P. fuscus* из популяции оз. Кругленькое характеризуются значи-



Дендрограмма сиквенсов гаплотипов *P. fuscus*, полученная на основе анализа нуклеотидной последовательности *CytB* методом минимальной эволюции; после видового названия на дендрограмме указан Accession № GenBank или полученный нами сиквенс, № гаплотипа, звездочкой обозначен номер нового для вида гаплотипа

тельно большей удаленностью как от ранее известных гаплотипов, так и от новых из оз. Садок. Так, согласно значениям p -дистанции, гаплотип E16 отдален от всех остальных гаплотипов дистанцией от 0.004 до 0.011; гаплотип E17 – дистанцией от 0.005 до 0.010. Наиболее удален от других гаплотипов E15 – от 0.017 до 0.026. Гаплотипы E15 и E17 образуют единый кластер I. Такие гаплотипы, как E1 – E7, E9 – E11, а также E14 и E16 также образуют единый, третий кластер, куда входят гаплотипы, удаленные от первых двух кластеров (см. рисунок).

Полученные результаты дают основание полагать, что совокупность гаплотипов *P. fuscus* из популяции оз. Кругленькое могла возникнуть позднее при заселении этого озера. Кроме того, несмотря на незначительную удаленность исследованных озёр друг от друга, локальные популяции чесночниц, нерестящиеся в них, оказались в значительной степени репродуктивно изолированными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сиквенсы гена мтДНК – *CytB*, особой нерестящихся в озёрах Садок и Кругленькое долины р. Медведица (Саратовская область), свидетельствуют об их принадлежности гаплотипам восточной формы *P. fuscus*. Такие результаты вполне согласуются с уже имеющимися данными о распространении чесночниц восточной формы в центре и на юго-востоке Европейской части России (Халтурин и др., 2003).

Детальный анализ сиквенсов гена мтДНК – *CytB* *P. fuscus* позволяет оценить генетическое разнообразие гаплотипов этого вида на исследуемой территории. Обнаружение новых гаплотипов в неизученных ранее локальных популяциях *P. fuscus* в Саратовской области свидетельствует о том, что разнообразие гаплотипов митохондриального гена *Cyt B* у этого вида еще недостаточно изучено. Были выявлены семь гаплотипов, из которых один был известен ранее (E9) (Crottini et al., 2007), а шесть оказались новыми для восточной формы этого вида: E12 – E17. Таким образом, из 61 исследованных ранее локальных популяций чесночницы обыкновенной было описано всего 11 гаплотипов, в то время как только из двух локальных саратовских популяций еще шесть. Поэтому есть основание полагать, что исследование генетического разнообразия локальных популяций *P. fuscus* на юго-востоке Европейской части России далеко от завершения и, очевидно, должно быть про-

должено. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы для решения проблемы внутренней генетической и экологической структуры чесночницы обыкновенной, а также для формирования представлений о происхождении локальных популяций этого вида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Боркин Л. Я., Литвинчук С. Н., Мильто К. Д., Розанов К. М., Халтурин М. Д. 2001. Критическое видообразование у *Pelobates fuscus* (Amphibia, Pelobatidae): цитометрические биохимические доказательства // Докл. РАН. Т. 376, № 5. С. 707 – 709.
- Демин А. Г., Полуконова Н. В., Мюге Н. С. 2011. Молекулярная филогения и время дивергенции комаров-звонцов (Chironomidae, Nematocera, Diptera) на основе частичной последовательности гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (COI) // Генетика. Т. 47, № 10. С. 1315 – 1327.
- Ермохин М. В., Табачишин В. Г. 2010. Динамика размерной и половой структуры сеголеток чесночницы обыкновенной – *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768) в пойме р. Медведицы // Совр. герпетология. Т. 10, вып. 3/4. С. 101 – 108.
- Ермохин М. В., Табачишин В. Г. 2011 а. Зависимость репродуктивных показателей самок *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768) от размерных и весовых характеристик // Совр. герпетология. Т. 11, вып. 1/2. С. 28 – 39.
- Ермохин М. В., Табачишин В. Г. 2011 б. Сходимость результатов учета численности мигрирующих сеголеток чесночницы обыкновенной, *Pelobatus fuscus* (Laurenti, 1768), при полном и частичном огораживании нерестового водоёма заборчиками с ловчими цилиндрами // Совр. герпетология. Т. 11, вып. 3/4. С. 121 – 131.
- Полуконова Н. В., Демин А. Г., Мюге Н. С., Шайкевич Е. В. 2009. Сравнение *Chironomus usenicus* и *Ch. curabilis* с видами группы *plumosus* (Diptera) по геном митохондриальной днк COI и рисунку дисков полигенных хромосом // Генетика. Т. 45, № 8. С. 1 – 7.
- Полуконова Н. В., Демин А. Г., Мюге Н. С. 2013. Молекулярные критерии в систематике насекомых: диапазон изменчивости штрихкодowego гена COI как таксономический критерий рода, трибы и подсемейства, на примере комаров-звонцов Chironominae и Orthocladiinae (Chironomidae, Diptera) // Журн. общей биологии. Т. 74, № 1. С. 66 – 76.
- Халтурин М. Д., Литвинчук С. Н., Боркин Л. Я., Розанов Ю. М., Мильто К. Д. 2003. Генетическая изменчивость у двух форм обыкновенной чесночницы *Pelobates fuscus* (Pelobatidae, Anura, Amphibia), различающихся по размеру генома // Цитология. Т. 45, № 3. С. 308 – 323.
- 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. P. 387 – 396.
- Cranston P., Hardy N., Morse G., Pusledni L. K., Mc Chuen S. R. 2010. When molecules and mor-

phology concur : the «Gondwanan» midges (Diptera : Chironomidae) // Systematic Entomology. Vol. 35, № 4. P. 636 – 648.

Crottini A., Andreone F., Kosuch J., Borkin L. J., Litvinchuk S. N., Eggert C., Veith M. 2007. Fossorial but widespread : the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability // Molecular Ecology. Vol. 16. P. 2734 – 2754.

Gissi C., Iannelli F., Pesole G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species // Heredity. Vol. 101. P. 301 – 320.

Hels T. 2002. Population dynamics in a Danish metapopulation of spadefoot toads *Pelobates fuscus* // Ecography. Vol. 25, № 3. P. 303 – 313.

Taberlet P., Bouvet J. 1992. Bear conservation genetics // Nature. Vol. 358. P. 197.

**A MOLECULAR-GENETIC STUDY OF SPADEFOOT TOAD
PELOBATES FUSCUS (LAURENTI, 1768) LOCAL POPULATIONS
FROM THE MEDVEDITSIA RIVER VALLEY (SARATOV REGION)
BY mtDNA – CytB GENE**

**A. V. Polukonova¹, A. G. Djomin¹, N. V. Polukonova²,
M. V. Yermokhin¹, and V. G. Tabachishin³**

¹ Saratov State University named after N. G. Chernyshevsky
33 Astrakhanskaya Str., Saratov 410012, Russia
E-mail: annypol@rambler.ru

² Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky
112 B. Kazach'ya Str., Saratov 410012, Russia

³ Saratov branch of A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences
24 Rabochaya Str., Saratov 410028, Russia

A part of the mtDNA – CytB gene of *Pelobates fuscus* from two local populations (Sadok and Kruglen'koye lakes, the Medveditsa river valley, Saratov region) was compared. All the nucleotide sequences of *P. fuscus* are most similar with the eastern form of this species. Seven gaplotypes were revealed from the 13 sequences analyzed. One of them had been known before (E9), and six ones were found for the first time and marked as E12 – E17. The unique gaplotypes of the spadefoot toad from the Kruglen'koye lake population (E15, E16, and E17) are characterized by significantly longer distances from the other known gaplotypes and from the new gaplotypes of the Sadok lake population. A first cluster of the dendrogram includes the new gaplotypes E15 and E17, a second cluster does the new gaplotypes E12 and E13, and a third cluster does the gaplotypes E1 – E7, E9 – E11 known before and two new ones (E14 and E16).

Key words: *Pelobates fuscus*, gaplotypes, Saratov region.