

## МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ У ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771)

© 2019 г. В. Л. Вершинин<sup>1, 2, 3, \*</sup>, И. А. Ситников<sup>1, 2</sup>, С. Д. Вершинина<sup>1</sup>,  
А. Г. Трофимов<sup>1, 2</sup>, А. А. Лебединский<sup>4</sup>, И. И. Миура<sup>3, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Институт экологии растений и животных Уральского отделения  
Российской академии наук, Екатеринбург, 620144 Россия

<sup>2</sup>Уральский федеральный университет, кафедра биоразнообразия и биоэкологии, Екатеринбург, 620002 Россия

<sup>3</sup>Хиросимский университет, Высшая школа наук, Центр исследования амфибий, Хигаши-Хиросима, 739-8526 Япония

<sup>4</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,  
кафедра ботаники и зоологии, Нижний Новгород, 603950 Россия

\*e-mail: vol\_de\_mar@list.ru

\*\*e-mail: imiura@hiroshima-u.ac.jp

Поступила в редакцию 05.12.2018 г.

После доработки 18.01.2019 г.

Принята к публикации 22.01.2019 г.

Впервые рассмотрены популяционные особенности ядерного и митохондриального геномов *P. ridibundus* Pallas, 1771 и сопутствующих видов зеленых лягушек Нижегородской и Свердловской областей. Подтверждено существование популяционной системы типа R–E–L на территории Нижегородской области. Установлено наличие гетероплазмии во всех обследованных выборках озерной лягушки, а также у гибридных – съедобных лягушек. Обнаруженные факты свидетельствуют о наличии гибридизации и интрогрессии, происшедших в истории исследуемых форм каждого из видов. Показана значительная неоднородность животных с территории Свердловской области по ядерному и в большей степени по митохондриальному геному, что с высокой вероятностью указывает на происхождение существующих на этой территории популяций в результате множественной интродукции. Полученные данные характеризуют состояние популяционных систем, а также историю процессов формирования современной картины филогеногеографии зеленых лягушек исследуемых территорий.

**Ключевые слова:** гетероплазмия, озерная лягушка, гибридизация, митотипы, ядерный геном.

**DOI:** 10.1134/S0016675819080174

Озерная лягушка – один из широкоареальных видов комплекса европейских зеленых (водных) лягушек. Вид населяет обширную территорию: Северная Африка, Передняя и Средняя Азия, Кавказ, Европа. Как известно, в Европе *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) составляет часть сложного гибридогенного комплекса – *P. esculentus* complex, для которого характерны гибридизация, полуклональное (или мероклональное) наследование, полиплоидия и разнообразие состава популяционных систем [1]. На восточном склоне Урала присутствует лишь один из видов комплекса зеленых лягушек – *P. ridibundus*, который сейчас на основании молекулярно-генетических данных считается сложным комплексом криптических видов [2].

В последние 40 лет на территории Азиатской России отмечается экспансия озерной лягушки за пределы ее естественного ареала на восток. Ис-

точниками случайной интродукции служат рыбноводные хозяйства, медицинские и биологические учреждения, использующие этот вид в своих экспериментах. Распространение озерной лягушки на северо-восток стало возможным благодаря производственной деятельности человека и связанным с ней повсеместным наличием термальных аномалий антропогенного и природного происхождения (Средний Урал, Якутск, Алтай, Сибирь, Камчатка). В настоящее время *P. ridibundus* – типичный синантропный вид амфибий на Урале. Как для Европы, так и для восточной части ареала озерной лягушки в России характерным является факт, что вселенцем чаще становится “восточная” форма озерной лягушки (*P. cf. bedriagae*) [3–5]. Существует гипотеза, что особи с митохондриальным геномом восточного типа (*P. cf. bedriagae*) толерантны к антропогенной трансформации среды и

по этой причине именно данные формы продвигаются на восток и север [6].

С.Н. Литвинчук и Й. Плетнер указывали (персональное сообщение), что *P. ridibundus* с восточного склона Среднего Урала по митохондриальному гену *ND3* совпадают с животными Харьковской, Киевской, Житомирской, Херсонской, Одесской и Воронежской областей. Вместе с тем Й. Плетнер отмечает, что родство в пределах группы *ridibundus* не может быть полностью выяснено на основе анализа митохондриальных генов *ND2* и *ND3* [7]. Для получения полной картины филогенетических взаимосвязей (систематический статус формы и ее родственные связи с другими) комплекса зеленых лягушек Палеарктики наряду с анализом митохондриальной ДНК требуется уделять внимание ядерным маркерам.

В течение 2017–2018 гг. в Нижегородской и Свердловской областях были отловлены зеленые лягушки для установления форм *P. ridibundus*, обитающих на этих территориях. Среди изученных 89 особей идентифицированы: 25 озерных, 58 прудовых и 6 съедобных лягушек. С помощью молекулярно-генетических методов обследовано девять взрослых особей *P. ridibundus* из Уральского региона (4 экз. – Екатеринбург, 2017 г., 5 экз. – г. Сухой Лог, 2018 г.), 16 *P. ridibundus* из Нижегородской области (15 экз. – г. Нижний Новгород, 2018 г. и 1 экз. – г. Дзержинск, 2017 г.). Также проанализирован ядерный и митохондриальный геномы *P. lessonae* (21 экз.) и все гибридные особи *P. cl. esculentus* (6 экз.).

Для выделения ДНК отбирались образцы свежих тканей двух первых фаланг пальцев с использованием набора PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen). Молекулярно-генетический анализ выполнен в лаборатории Центра исследования амфибий Хиросимского университета (Япония). При использовании стандартного набора реактивов была проведена серия ПЦР для подбора и оптимизации праймеров. Была амплифицирована часть (981 пн) гена цитохрома *b* (*Cyt b*) митохондриальной ДНК и часть (206 пн) гена сывороточного альбумина (ген *SAT*) интрона 1 ядерного генома и определены последовательности. ПЦР проводили с использованием КАРАТaq EXtra HotStart ReadyMix с красителем (Genetics, Japan) следующим образом: 1 мкл ДНК амплифицировали в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12.5 мкл буфера и 0.5 мкл каждого из праймеров (концентрация праймеров 12.5 мкМ) при 94°C в течение 40 с, 55°C в течение 20 с и 72°C 1 мин в течение 35 циклов с использованием LifeEco (технология Bioer).

Для амплификации гена цитохрома *b* были использованы прямой 5'-CTC CTG GGA GTC TGC STA ATC-3' (L *Cytb* (F) [8]) и обратный 5'-GTC TTT GTA GGA GAA GTA TGG-3' [8]

праймеры, а для интрона 1 гена сывороточного альбумина прямой 5'-TCC ATA CAT GTG STA AGT AGG TT-3' и обратный 5'-GAC GGT AAG GGG ACA TAA TTCA-3' праймеры [9]. Для определения первичной структуры ДНК секвенирования использовался генетический анализатор ABI PRISM 3130 XL genetic analyzer (Applied Biosystem, США).

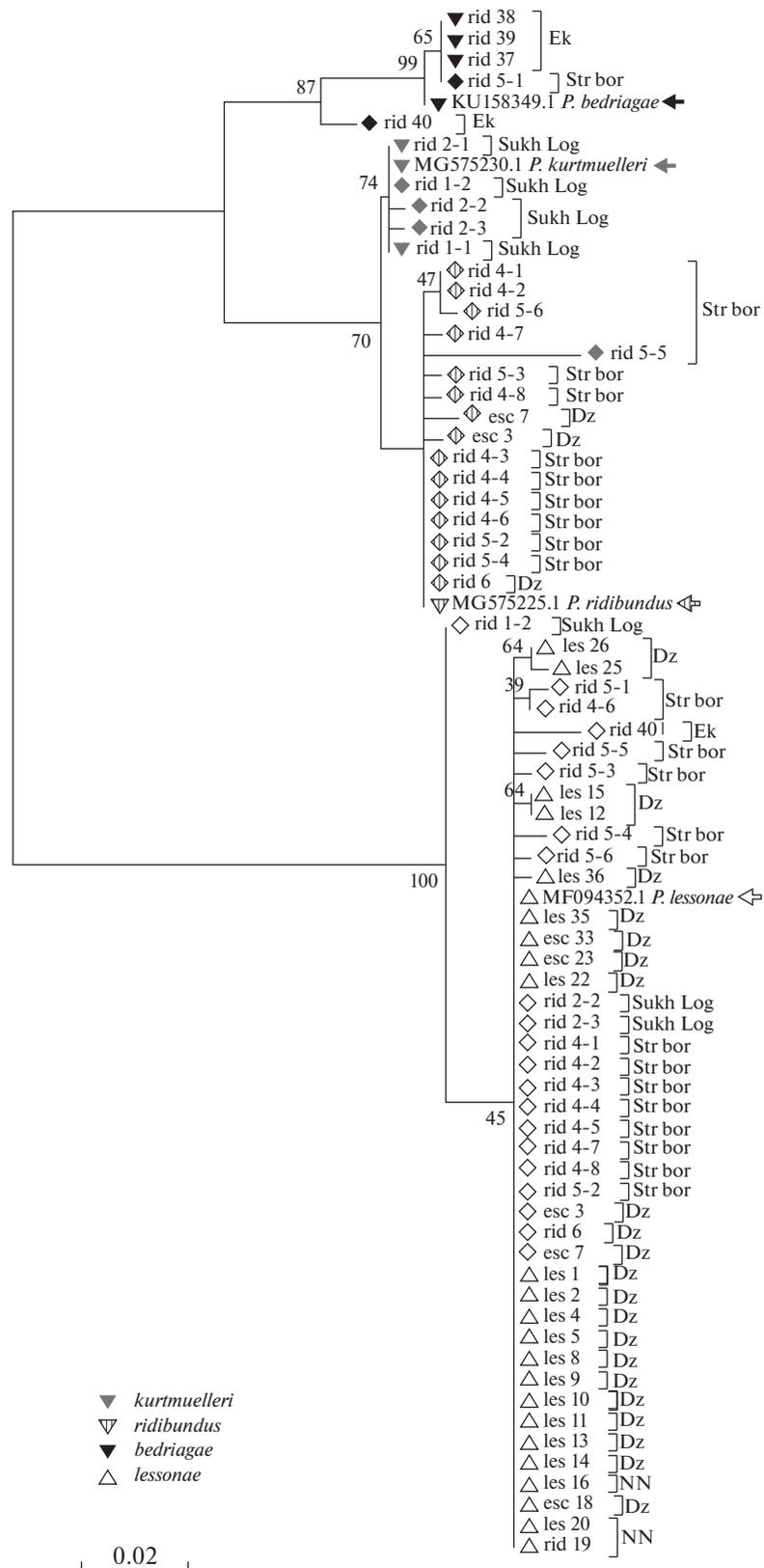
Соотношение видов в нижегородских выборках составило 74% прудовых, 18% – озерных и 8% – съедобных лягушек, что подтверждает существование на территории Нижегородской области (в Нижнем Новгороде и в г. Дзержинске) популяционной системы, относящейся к R–E–L (*ridibundus–esculentus–lessonae*) типу, где доля *P. esculentus* составляют менее 10% [10].

Территория Свердловской области заселена исключительно озерной лягушкой. Установлено, что животные из екатеринбургской популяции по маркирующим последовательностям ядерной ДНК соответствуют восточным группам *P. cf. bedriagae*. Только одна из особей (F19) попала в кладу нижегородских выборок (Стригинский Бор). Вторая выборка озерной лягушки из Свердловской области (г. Сухой Лог) оказалась неоднородной по ядерному геному и состояла из двух особей (*rid* 1-2 и *rid* 2-3), принадлежащих к “восточной” форме *P. ridibundus* (*P. cf. bedriagae*), в то время как 3 экземпляра (*rid* 1-1, *rid* 2-1 и *rid* 2-2) относились к “западной” форме (*P. ridibundus sensu lato* или *P. kurtmuelleri*). По маркирующим последовательностям митохондриальной ДНК (*Cyt b*) три из четырех животных (*rid* 37, *rid* 38 и *rid* 39) екатеринбургской выборки соответствуют “анатолийской” *P. bedriagae*, населяющей восточную часть ареала. У одной особи (*rid* 40) отмечена гетероплазмия, что предполагает скрещивание с прудовой лягушкой и интрогрессию, которая могла происходить в истории исследуемых форм. Однако этот индивидуум также показал несколько более низкую гомологию с последовательностью *P. bedriagae*, что дает возможность полагать иное ее происхождение из разных линий. Митохондриальные геномы всех особей выборки из Сухого Лога (*rid* 1-1–*rid* 2-3) имеют мтДНК “балканской” формы *P. kurtmuelleri*, при этом у трех животных (*rid* 1-2, *rid* 2-2 и *rid* 2-3) отмечена гетероплазмия – присутствие гаплотипа прудовой лягушки. Состояние гетероплазмии – наличие более чем одного типа митохондриального генома в организме – нередко встречается как у животных, так и у растений [11], а также в гибридогенном комплексе – *Pelophylax* spp. [12].

Озерные лягушки из пригорода Нижнего Новгорода (Стригинский Бор) по ядерному геному, за исключением одной особи (*rid* 19, рис. 1), относящейся к “восточной” *P. bedriagae*, являются носителями маркеров “западной” формы (*P. ridibundus*). Митохондриальные геномы данной выборки (*rid* 4-1–



**Рис. 1.** Стандартная ML-дендрограмма дистанционности озерных лягушек и гибридов (*P. esculentus*) по первому интрону гена сывороточного альбумина (ген *SAL1*) методом максимального сходства. Стрелками указаны стандартные последовательности исследуемого гена для соответствующих форм, взятых из GenBank. Виды: rid – озерная лягушка, esc – съедобная лягушка, les – прудовая лягушка; цифры означают номер особи. Местообитания: NN – Нижний Новгород, Dz – Дзержинск, Ek – Екатеринбург, Str bor – Стригинский Бор, Sukh Log – Сухой Лог.



**Рис. 2.** Дистанцированность исследованных особей *Pelophylax* по гену первой субъединицы цитохромоксидазы (*COI*) методом максимального сходства. Стрелками указаны стандартные последовательности исследуемого гена для соответствующих форм, взятых из GenBank. Ромбом обозначена гетероплазмия. Обозначения — см. подпись к рис. 1.

rid 6) несут “западную” мтДНК в сочетании с гаплотипом *P. lessonae*, за исключением одной особи (rid 19), сочетающей гаплотипы *P. bedriagae* и *P. lessonae* (рис. 2). Одна озерная лягушка (rid 19, рис. 2), отловленная там же в 2017 г., имеющая “западный” ядерный геном, оказалась носителем мтДНК с гаплотипом прудовой лягушки. Данный факт является свидетельством интрогрессий генетического материала (мтДНК) от прудовой лягушки, что нередко отмечается в центре ареала [13]. Единственный экземпляр (rid 6) *P. ridibundus* из окрестностей г. Дзержинска оказался обладателем гетерогенного ядерного генома “балканской” формы и *P. kurtmuelleri* с гетероплазмией по мтДНК – *P. lessonae* и *P. ridibundus*.

Пять гибридных особей *P. esculentus* были идентифицированы на основе интрона 1 альбумина сыворотки и двух других генов – *SOX3* и *Rhodopsin*. У двух животных (esc 3 и esc 7) отмечена гетероплазмия мтДНК: *P. ridibundus* и *P. lessonae*, в то время как другие три (esc 23, esc 33, esc 18; рис. 2) обладают только гаплотипом *P. lessonae*. Ядерный геном гибридов (esc 3, esc 7, esc 18 и esc 23) в пяти случаях содержит маркеры ДНК “западной” формы озерной лягушки – *P. ridibundus* или *P. kurtmuelleri*, а у одной особи (esc 33) отмечен гаплотип *P. bedriagae* (рис. 2).

Следовательно, выборки зеленых лягушек из Нижегородской области характеризуются высоким разнообразием комбинаций ядерных геномов (RR, BB, KK, RL, BL, LL: R – *ridibundus*, B – *bedriagae*, K – *kurtmuelleri*, L – *lessonae*) и меньшим числом вариантов митохондриальной гетероплазмы (RL, BL). С другой стороны, образцы из Свердловской области (представленные меньшим числом животных) демонстрируют высокую разнородность митохондриального генома (BB, RL, KK, KL) при меньшем разнообразии вариантов ядерного генома (BB, RR). Высокое разнообразие митотипов среднеуральских популяций озерной лягушки свидетельствует о многократной интродукции животных из различных источников, как мы предполагали ранее [14].

Известно, что захват чужих митохондрий одного из родительских видов при гибридогенезе и последующей интрогрессии способен повышать адаптивный потенциал форм-акцепторов таких митохондрий [11, 15].

Таким образом, полученные данные характеризуют состояние популяционных систем, а также историю формирования современной филогенгеографии зеленых лягушек исследуемых территорий.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН, а также частично поддержана Комплексной программой УрО РАН (проект № 18-4-4-28), грантом РФФИ (№ 18-54-50013), а

также программой 211 Правительства Российской Федерации, соглашение № 02.А03.21.0006.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinogradov A.E., Borkin L.J., Gunther R., Rosanov J.M. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: Cytological evidence from DNA flow cytometry // Genome. 1990. V. 33. № 5. P. 619–627.
2. Боркин Л.Я., Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Скопинов Д.В. О криптических видах (на примере амфибий) // Зоол. журн. 2004. Т. 83. № 8. С. 936–960.
3. Pagano A., Joly P., Plénet S. et al. Breeding habitat partitioning in the *Rana esculenta* complex: the intermediate niche hypothesis supported // Ecoscience. 2001. V. 8. № 3. P. 294–300.
4. Holsbeek G., Mergeay J., Hotz H. et al. A cryptic invasion within an invasion and widespread introgression in the European water frog complex: consequences of uncontrolled commercial trade and weak international legislation // Mol. Ecol. 2008. V. 17. № 23. P. 5023–5035.
5. Dubey S., Leuenberger J., Perrin N. Multiple origins of invasive and “native” water frogs (*Pelophylax* spp.) in Switzerland // Biol. J. Linn. Soc. 2014. V. 112. № 3. P. 442–449.
6. Ермаков О.А., Файзулин А.И., Закс М.М. и др. 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. Самарск. центра РАН. 2014. Т. 16. № 5(1). С. 409–412.
7. Plötner J. Die westpalaarktischen Wasserfrösche – Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Bielefeld: Laurenti Verlag, 2005. 160 s.
8. Tanaka T., Matsui M., Takenaka O. Phylogenetic relationships of Japanese brown frogs (*Rana*: Ranidae) assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences // Biochem. Syst. Ecol. 1996. V. 24. P. 299–307.
9. Hauswaldt J.S., Hoer M., Ogielska M. et al. A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*) // Mol. Ecol. Resour. 2012. V. 12. № 5. P. 797–805.
10. Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Mannapova E.I. et al. The distribution of green frogs (*Rana esculenta* complex) in Nizhniy Novgorod Province, Central European Russia // Russ. J. Herpetol. 2002. V. 9. № 3. P. 195–208.
11. Kmiec B., Woloszyńska M., Janska H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals // Curr. Genet. 2006. V. 50. № 3. P. 149–159.
12. Radojčić J.M., Krizmanić I., Kasapidis P., Zouros E. Extensive mitochondrial heteroplasmy in hybrid water frog (*Pelophylax* spp.) populations from Southeast Eu-

- rope // Ecol. Evol. 2015. V. 5. № 20. P. 4529–4541.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.1692>
13. Plötner J., Uzzell T., Beerli P. et al. Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palaearctic water frogs // J. Evol. Biol. 2008. V. 21. № 3. P. 668–681.
14. Большаков В.Н., Пястолова О.А., Вершинин В.Л. Специфика формирования видовых сообществ животных в техногенных и урбанизированных ландшафтах // Экология. 2001. № 5. С. 343–354.
15. Столбунова В.В., Кодухова Ю.В. Влияние дивергенции геномов плотвы *Rutilus rutilus* (L.) и леща *Abramis brama* (L.) на морфотип гибридов // Тез. конф. “Морфогенез в индивидуальном и историческом развитии: онтогенез и формирование биологического разнообразия”, 22–24 ноября 2017 г. М., ИТО ПИН РАН, М., 2017. С. 65–66.

## Mitochondrial Heteroplasmy in Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771)

V. L. Vershinin<sup>a, b, c, \*</sup>, I. A. Sitnikov<sup>a, b</sup>, S. D. Vershinina<sup>a</sup>,  
 A. G. Trofimov<sup>a, b</sup>, A. A. Lebedinsky<sup>d</sup>, and I. J. Miura<sup>c, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, 620144 Russia

<sup>b</sup>Department of Biodiversity and Bioecology Ural Federal University, Ekaterinburg, 620002 Russia

<sup>c</sup>Amphibian Research Center, Graduate School of Science, Hiroshima University 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

<sup>d</sup>Department of Botany and Zoology, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

\*e-mail: vol\_de\_mar@list.ru

\*\*e-mail: imiura@hiroshima-u.ac.jp

For the first time, the population characteristics of the nuclear and mitochondrial genomes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and associated species of green frogs of the Nizhny Novgorod and Sverdlovsk region are investigated. The existence of a population system of the R-E-L type in the territory of the Nizhny Novgorod region was confirmed. The presence of heteroplasmy was found in all the examined samples of the marsh frog, as well as in hybrid – *P. resculentus*. The research indicates the presence of hybridization and introgressions that occurred in the past history of the studied forms of each of the species under investigation. Significant heterogeneity of animals from the territory of the Sverdlovsk region of the nuclear and to a bigger extent of the mitochondrial genome were shown, which, with a high probability, indicates the origin of populations existing in this territory as a result of multiple introductions. The obtained data characterize the state of population systems, as well as the history of the processes of formation of the modern state of the phylogeography of green frogs of the studied territories.

**Keywords:** heteroplasmy, marsh frog, hybridization, mitotypes, nuclear genome.