

С.Ю. МОРОЗОВ-ЛЕОНОВ ¹,
С.В. МЕЖЖЕРИН ¹, Ф.Ф. КУРТЯК ²

¹ Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена
НАН Украины, Киев

² Ужгородский национальный университет

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОДНОПОЛЫХ ГИБРИДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЯГУШЕК *RANA ESCULENTA* COMPLEX В РАВНИННОМ ЗАКАРПАТЬЕ



Биохимическое генное маркирование, анализ пloidности и половой структуры популяций зеленых лягушек Закарпатской равнины показали, что эти места населяют однополые популяции, состоящие исключительно из самок-аллодиплоидов, которые включают в свой геном незначительную долю генного разнообразия озерной лягушки. Феномен обсуждается в связи с проблемой воспроизводства однополых популяций. Выдвигается предположение, что в гибридных популяциях Закарпатья размножение гибридов происходит путем партеногенеза.

© С.Ю. МОРОЗОВ-ЛЕОНОВ, С.В. МЕЖЖЕРИН,
Ф.Ф. КУРТЯК, 2003

Введение. Популяции западнопалеарктических зеленых лягушек комплекса *Rana esculenta* L., 1758 являются перспективной моделью для эволюционно-генетических исследований. Такого типа гибридизация не встречается больше ни у одного наземного позвоночного в Северной Евразии. Причина — совершенно уникальная структура и способ воспроизводства гибридов, которые являются аллодиплоидами, а в некоторых случаях — аллотриплоидами, передающими последующим поколениям лягушек, как правило, геном только одного из родительских видов, тогда как геном второго элиминируется в период гаметогенеза [1–3]. Некоторая генетическая автономность гибридов и постоянство их генетической структуры дали основание для придания им таксономического статуса [4–6]. Особый интерес вызывает разнокачественность гибридных популяций и самих гибридов по ареалу, а также неоднозначность механизмов их размножения в разных географических популяциях. На большей части ареала, в частности на территории Украины [7–9], гибриды являются составляющей частью популяций родительских видов, и их воспроизводство в поколениях осуществляется только путем возвратных скрещиваний с одним из родительских видов, что обусловлено низкой выживаемостью гибридов F₂. В Центральной Европе, напротив, есть популяции, которые на 90 % состоят из гибридов и, следовательно, должны хотя бы частично воспроизводиться путем скрещиваний гибридов в себе [10–12]. На территории Украины регионом, где возможно существование таких популяций, является равнинное Закарпатье, занимающее часть Паннонской низменности. Именно в Паннонии отмечается тенденция к образованию гибридных популяций с незначительным содержанием родительских видов, при этом гибриды в подавляющем большинстве являются самками [12]. Однако все эти исследования проведены без генетического маркирования лягушек; определение гибридов проводилось по морфологическим признакам, которые не дают 100%-ной диагностики [13], а потому результаты по структуре популяций требуют строгого генетического анализа. Цель настоящего исследования состояла в анализе генетической структуры популяций комплекса зеленых лягушек, населяющих низменную часть Закарпатской области.

Материалы и методы. Материалом послужила серия выборок из равнинной части южных и

западных окраин г. Ужгорода. Основной материал был взят из изолированного водоема, располагающегося возле с. Минай, на южной окраине Ужгорода. Водоем (Минай-1) площадью около 1000 м² образовался в 1989 г. на месте котлована, по берегам зарос осокой. Глубина озера не превышает 1 м. Преобладающий вид растительности — элодея. Ближайший водоток (ирригационный канал, соединенный с р. Латорица) расположен в 50 м. В настоящее время канал полностью зарос и высох. В 300 м от котлована на месте бывшего канала сохранилось болото площадью не более 20 м² и глубиной до полуметра (Минай-2). Это ближайшее к изучаемому озеру Минай-1 место обнаружения зеленых лягушек представляет собой небольшое болото, заросшее камышом. Объем выборки, взятой в мае из Минай-1 — 49 особей. Осенью из того же водоема была повторно взята выборка сеголеток (33

экз.). Из Минай-2 в первой декаде октября была взята выборка объемом 22 особи (6 взрослых и 16 ювенильных). В дополнение к этим выборкам осенью на равнине в окрестных лесах было отловлено еще 21 экз. (выборка Переш). Кроме того, в качестве контроля в начале предгорий в западных окрестностях Ужгорода из недавно вырытого глубокого котлована рядом с городским аэропортом (выборка «Аэропорт») взята еще одна выборка (7 экз.).

Половую принадлежность определяли только у половозрелых особей путем вскрытия. Генетическую идентификацию лягушек, отловленных весной, проводили путем анализа генотипов по ряду локусов (Ldh-B, sAat, mAat, Es-1, Es-5, Me-1), имеющих фиксацию аллелей, диагностических для озерной и прудовой лягушек. Осенью в качестве диагностического использован только локус Ldh-B. Пloidность была определена анализом кариотипа на препаратах, приготовленных по стандартной для земноводных методике [14].

Результаты исследований. Генное маркирование. В результате мультилокусного генного маркирования, которое проведено в выборках, собранных весной, установлено, что у лягушек из Минай-1 все особи были гибридами первого поколения, а в районе городского аэропорта были отловлены 6 особей озерных лягушек и 1 гибрид (табл. 1). Четкое соответствие гибридных генотипов разных локусов позволило в осенних выборках ограничиться только анализом Ldh-B. В результате генного маркирования установлено, что все лягушки из Минай-1 (сеголетки), Минай-2 и Переша были гибридами (табл. 1).

Сопоставление генных частот полиморфных локусов у озерных лягушек из района аэропорта и части генома гибридов, привнесенной озерной лягушкой, показывает их высокодостоверные различия. Так, всего у 3 гибридов отмечен аллель Ldh-BRf, что составляет $0,03 \pm 0,05$, тогда как в популяции лягушек из аэропорта частота его существенно выше и равна $0,61 \pm 0,13$ ($t = 4,46$; $p < 0,001$). Достоверная тенденция преобладания альтернативных аллелей наблюдается и по локусу Me-1. Так, у гибридов из Минай фиксирован аллель Me-1^{R2}, тогда как у лягушек из аэропорта преобладает аллель Me-1^{R1} с частотой 0,85. Приведенные факты служат не только доказательством того, что озерные лягушки, ныне живущие под Ужгородом, не являются предковыми для

Таблица 1
Распределение генотипов диагностических локусов у зеленых лягушек в равнинном Закарпатье

Локус	Генотипы	Выборки				
		Минай-1 (лето)	Минай-1 (осень)	Минай-2 (осень)	Переш (осень)	Аэропорт (лето)
Ldh-B	Ls/77	36	16	17	17	—
	Ls/Rf	1	0	0	2	1
	Lf/77	10	15	5	0	—
	Lf/Rf	2	2	0	2	—
	77/Rf	—	—	—	—	4
	Rf/Rf	—	—	—	—	2
Aat-1	L/R	49	—	—	—	1
	R/R	—	—	—	—	6
Aat-2	L/R	49	—	—	—	1
	R/R	—	—	—	—	6
Es-5	L/R	49	—	—	—	1
	R/R	—	—	—	—	6
Es-1	L/Rs	11	—	—	—	—
	L/Rf	29	—	—	—	—
SMe	L/R1	—	—	—	—	1
	L/R2	49	—	—	—	—
	R1/R1	—	—	—	—	5
	R2/R2	—	—	—	—	1

гибридов, но и подтверждением объединения генного разнообразия у гибридов по геному озерной лягушки, что четко проявляется по двум (Ldh-B, Me-1) самым полиморфным у *R. ridibunda* локусам [15, 16].

Сопоставление частот аллелей локуса Ldh-B в популяции Минай-1 у взрослых, отловленных весной, и сеголеток — осенью, показало стабильность генных частот в части генома озерной лягушки (табл. 2) и явные изменения генома прудовой. Так, частота особей — носителей аллеля L_1 — увеличивается с $0,24 \pm 0,06$ до $0,51 \pm 0,09$ ($t = 2,45$; $p < 0,01$). Причин изменения частоты может быть несколько: селективность размножения разных форм гибридов или скрещивания гибридов с прудовой лягушкой, отличающихся частотами аллелей.

Анализ кариотипов. У всех 44 изученных половозрелых лягушек (16 весной и 28 осенью) обнаружен диплоидный набор хромосом $2n = 26$ [2].

Половая структура. Все 58 половозрелых гибридов оказались самками (Минай-1 — 49 экз., Минай-2 — 6 экз., Переш — 3 экз.). Состояние гонад соответствовало сезонам размножения. Аномалии развития половых органов не отмечены.

Обсуждение полученных данных. Все без исключения добытые на Закарпатской равнине зеленые лягушки генетически по изученным диагностическим локусам идентифицированы как гибриды (табл. 3). Исключением является район аэропорта, где равнина граничит с предгорьями. Результат подтвержден для разных сезонов (весна и осень), возрастного состава популяций (сеголетки, половозрелые) и разных биотопов (озеро, болото, лес). Только в предгорьях в районе городского аэропорта были обнаружены озерные лягушки, которые, однако, по аллельному составу резко отличаются от предковых озерных лягушек, давшим начало гибридным популяциям на равнине.

Все проанализированные половозрелые лягушки с равнины оказались самками, причем с нормально развитыми гонадами.

Все 44 особи, изученные кариологически, оказались диплоидами и имели 26 хромосом, что подтверждает амфигаплоидную структуру гибридов.

Таким образом, в результате комплексного анализа доказано, что в равнинном Закарпатье, в частности в окрестностях Ужгорода, популяции зеленых лягушек состоят исключительно из

диплоидных гибридных самок. В какой-то степени данный результат совпадает с материалами других исследователей, полученными для прилегающих к Закарпатыю регионов Венгрии, Словакии и Польши, где в гибридных популяциях преобладают самки и диплоиды, хотя на севере — на равнинах Польши — высока доля триплоидов, тогда как в равнинном Закарпатье в районе Ужгорода мы имеем дело с гибридными диплоидными популяциями, состоящими исключительно из самок, что остро ставит вопрос о механизмах их репродукции. Следует, однако, подчеркнуть, что полностью исключить присутствие самцов и триплоидов в изученном регионе мы не можем, хотя их доля, судя по числу исследованных на сегодня гибридных особей, составит не более 5 % от особей в популяции.

Обнаружение такого уникального поселения гибридных лягушек ставит вопрос: каким образом воспроизводятся эти однополые изолированные популяции? На наш взгляд, возможны три варианта объяснения феномена однополых гибридных популяций.

1. Размножение зеленых лягушек в водоемах Минай-1 и Минай-2 не происходит вообще, а популяции формируются за счет миграций гибридов, например, из предгорий Карпат, где обитают оба родительских вида и постоянно происходит гибридизация. Это объяснение неприемлемо из-за следующих обстоятельств. Во-первых, непо-

Таблица 2
Сопоставление частот аллелей локуса Ldh-B у сеголеток и взрослых лягушек из местообитания Минай-1

Лягушки	L_1	L_2	η	R_1	n
Взрослые	0,378	0,122	0,469	0,031	49
Сеголетки	0,242	0,258	0,470	0,030	33

Таблица 3
Видовой состав популяции зеленых лягушек Закарпатья

Генетическая форма	Минай-1	Минай-2	Переш	Аэропорт
Прудовые лягушки	—	—	—	—
Гибриды	82	22	21	1
Озерные лягушки	—	—	—	6

нятно, почему на равнину спускаются только гибриды. Во-вторых, имеющиеся полевые наблюдения подтверждают факт размножения зеленых лягушек на равнине. Так, в озере Минай-1 летом были обнаружены головастики зеленых лягушек последних стадий, а осенью на его берегах были отловлены сеголетки.

2. Один из родительских видов (прудовая лягушка) приходит в водоемы только весной на период нереста, а потом уходит жить на сушу или в другие водоемы. Как известно [17], полусухопутный образ жизни свойствен прудовой лягушке, которая в воде проводит период размножения с апреля по июнь, а затем переходит практически к наземному образу жизни. Однако все исследованные зеленые лягушки, пойманные осенью на суше в лесу (Переш, 21 экз.), оказались гибридами. Следует обратить внимание также и на то обстоятельство, что механизм наследования у гибридов из бассейна Дуная неоднороден. В дельте Дуная элиминируется геном *R. ridibunda* [18]; на территории Югославии ситуация обратная — гибриды этот же геном наследуют [12]. Исходя из этого обстоятельства, в Закарпатье можно ожидать смешанных популяций гибридов с озерной лягушкой, а последние строго привязаны к водоемам и потому их очень легко обнаружить. Следует также подчеркнуть, что озерные лягушки Закарпатья, отловленные нами в районе городского аэропорта, обладали иным генным пулом (табл. 1), чем озерные лягушки, давшие гибридов в Минае-1. Таким образом, вероятность второго варианта образования летних однополых популяций весьма незначительна.

3. Размножение гибридов происходит путем партеногенеза без какого-либо участия самцов. Этот способ размножения известен у рептилий, в форме гиногенеза встречается у рыб, но не известен у бесхвостых амфибий, хотя известен у хвостатых [19]. Кстати, гипотеза партеногенетического размножения у гибридов зеленых лягушек, но в форме гиногенеза уже высказывалась [20, 21], хотя практического развития и не получила. Важно подчеркнуть то обстоятельство, что аллодиплоидные популяции (в том числе и зеленых лягушек), устойчиво сохраняющиеся в ряду поколений, невозможны по определению из-за того, что они продуцируют гаметы одного из родительских видов и, следовательно, в любом

случае в популяциях будут вновь появляться особи родительских видов. Кроме того, при скрещиваниях гибридов зеленых лягушек в себе [22, 23] потомство практически не выживает, поэтому устойчивое существование популяций гибридов возможно только в случае их аллотриплоидии или по крайней мере смеси аллоди- и аллотриплоидных гибридов, когда один из полов является триплоидом, что, как считается, имеет место в Польше [6].

Таким образом, на современном уровне знаний, кроме партеногенеза, отсутствует однозначное и ясное объяснение механизмов поддержания аллодиплоидных однополых популяций. Однако факт партеногенеза у лягушек до сих пор неизвестен.

SUMMARY. The biochemical genetic marking and analysis of the ploidy and sexual structure of the green frog populations from the Transcarpathian lowlands have demonstrated that this region is inhabited by the unisexual populations composed of the allodiploid females only. Their genome includes a small portion of the marsh frog genic diversity. This phenomenon is discussed in relation to the unisexual population reproduction problem. The assumption is proposed that in the Transcarpathian hybrid populations the hybrids are spawned by the parthenogenesis.

РЕЗЮМЕ. Біохімічне генне маркування, аналіз плідності та статеві структури популяцій зелених жаб Закарпатської рівнини показали, що ці місця населяють одностатеві популяції, складені виключно з самиць-аллодиплоїдів, що включають до свого геному незначну частку генного різноманіття озерної жаби. Феномен обговорюється у зв'язку з проблемою відтворення одностатевих популяцій. Висунуто припущення, що у гібридних популяціях Закарпаття розмноження гібридів відбувається шляхом партеногенезу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berger L. On the origin of genetic systems in European water frog hybrids // Zool. Pol. — 1988. — 35. — P. 5–32.
2. Bucci S., Ragghianti M., Mancino G., Berger L., Hotz H., Uzzell T. Lampbrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing hybrid *Rana esculenta* and its parental species // J. Exp. Zool. — 1990. — 255. — P. 37–56.
3. Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry // Genome. — 1990. — 33. — P. 619–627.
4. Hotz H., Uzzell T., Beerli P., Guex G.-D. Are hybrids clonal species? A case for enlightened anarchy // Amph.-Rept. — 1996. — № 17. — P. 315–320.

5. Dubois A. Nomenclature of parthenogenetic, gynogenetic and «hybridogenetic» vertebrate taxons: new proposals // *Alytes*. — 1991. — № 8. — P. 61–74.
6. Günther R. Europäische Wasserfrösche (Anura, Ranidae) und biologisches Artkonzept // *Mitt. Zool. Mus. Berl.* — 1991. — 67, № 1. — P. 39–53.
7. Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю. Популяционно-генетический анализ структуры гибридных популяций *Rana esculenta* complex // *Цитология и генетика*. — 1993. — 27, № 2. — С. 63–68.
8. Морозов-Леонов С.Ю., Межжерин С.В. Анализ генетической структуры гибридной популяции зеленых лягушек *Rana esculenta* complex из плавней Дуная // *Цитология и генетика*. — 1995. — 29, № 2. — С. 71–76.
9. Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю. Генетический анализ структуры гибридных популяций зеленых лягушек *Rana esculenta* L. complex (*Amphibia, Ranidae*) Волыни // *Цитология и генетика*. — 1993. — 27, № 2. — С. 63–68.
10. Günther R., Hähnel S. Untersuchungen über den Genfluss zwischen *Rana ridibunda* und *Rana lessonae* sowie die Rekombinationsrate bei der Bastardform *Rana «esculenta»* (Anura, Ranidae) // *Zool. Anz.* — 1976. — 197. — P. 23–38.
11. Berger L. An all-hybrid water frog population persisting in agroecosystems of central Poland (Amphibia, Salientia, Ranidae) // *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* — 1991. — 140, № 1. — P. 202–219.
12. Berger L., Uzzell T., Hotz H. Sex determination and sex ratios in Western Palearctic water frogs: XX and XY female hybrids in the Pannonian Basin? // *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* — 1991. — 140, № 1. — P. 220–239.
13. Günther R., Plötner J., Tetzlaff I. Zu einigen Merkmalen der Wasserfrösche (*Rana* synkl. *esculenta*) des Donau-Deltas // *Salamandra*. — 1991. — 27, № 4. — P. 246–265.
14. Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. — М.: Мир, 1986. — 272 с.
15. Межжерин С.В., Песков В.Н. Аллозимная изменчивость озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. // *Цитология и генетика*. — 1992. — 26, № 12. — С. 43–48.
16. Beerli P. Genetic isolation and calibration of an average protein clock in western Palearctic water frogs of the Aegean region // *Inaugural-Dissertation zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde vorgelegt der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich*. — Zürich, 1994. — 94 p.
17. Tunner H.G. Locomotory behaviour in water frogs from Neusiedlersee (Austria, Hungary). 15 km migration of *Rana lessonae* and its hybridogenetic associate *Rana esculenta* // *Proc. Sixth Ord. Gen. Meet. S. E. H.* — Budapest, 1992. — P. 449–452.
18. Морозов-Леонов С.Ю. Генетичні процеси в гібридних популяціях зелених жаб *Rana esculenta* complex України : Автореф. ... дис. канд. біол. наук. — Київ, 1998. — 24 с.
19. Bogart J. P., Elinson R. P., Licht L. E. Temperature and sperm incorporation in polyploid salamanders // *Science*. — 1989. — 246. — P. 1032–1034.
20. Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В.Г., Рустамов А.К., Щербак Н.Н. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. — М.: Просвещение, 1977. — 415 с.
21. Schmidt B.R. Are hybridogenetic frogs cyclical parthenogens? // *Trends in ecology and evolution*. — 1993. — 8, № 8. — P. 271–272.
22. Reyer H.-U., Frei G., Som C. Cryptic female choice: frogs reduce clutch size when amplexed by undesired males // *Proc. R. Soc. Lond.* — 1999. — 266. — P. 2101–2107.
23. Бергер Л. Является ли прудовая лягушка *Rana esculenta* complex обыкновенным гибридом? // *Экология*. — 1976. — № 2. — С. 37–43.

Поступила 30.01.02