

УДК 575.1:597.828

ЭВОЛЮЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУКЛОНАЛЬНОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА ГИБРИДНОЙ ФОРМЫ *RANA KL. ESCULENTA* (AMPHIBIA, RANIDAE)

С. В. Межжерин, С. Ю. Морозов-Леонов, О. Д. Некрасова, Ф. Ф. Куртяк,
Д. А. Шабанов, А. В. Коршунов

*Эволюционно-генетические аспекты полуклонального воспроизводства гибридной формы *Rana kl. esculenta* (Amphibia, Ranidae). — С. В. Межжерин¹, С. Ю. Морозов-Леонов¹, О. Д. Некрасова¹, Ф. Ф. Куртяк², Д. А. Шабанов³, А. В. Коршунов⁴. — Изучена изменчивость гена *Ldh-B* зеленых лягушек рода *Rana*: гибридной формы *Rana kl. esculenta* и родительского вида – озерной лягушки *Rana ridibunda*. Показано снижение уровня наследственной изменчивости гибридной формы сравнительно с родительским видом. Причиной этого предполагается полуклональное воспроизводство гибридной формы рекомбинации при мейозе.*

Ключевые слова: полуклональное наследование, мейоз, *Rana kl. esculenta*, гетерозиготность

Адреса: ¹ Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев-30, ГСП, 01601 Украина, e-mail: morleone2000@hotmail.com; ² Ужгородский национальный университет, ул. Волошина, 32, Ужгород, 88000 Украина, e-mail: kurtyak@bk.ru; ³ Биологический факультет Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: d_sh@list.ru; ⁴ НИИ Биологии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: alexey_korshunov@list.ru.

*Evolutionary genetic aspects of the hybrid form *Rana kl. esculenta* (Amphibia, Ranidae) hemiclinal reproduction. — S. V. Mezherin¹, S. Yu. Morozov-Leonov¹, O. D. Nekrasova¹, F. F. Kurtyak², D. A. Shabanov³, A. V. Korshunov⁴. — The *Ldh-B* gene variation was studied within the green frogs genus *Rana*: the hybrid form *Rana kl. esculenta* and the parental species – marsh frog *Rana ridibunda*. The decreasing of the heritable variation level within the hybrid form comparatively to the parental species was shown. The cause of it is assumed to be the hybrid form hemiclinal reproduction without the recombination.*

Keywords: hemiclinal inheritance, meiosis, *Rana kl. esculenta*, heterozygosity

Address: ¹ Institute of zoology NAN of Ukraine, B. Khmelnytsky st., 15, Kiev-30, GSP, 01601 Ukraine, e-mail: morleone2000@hotmail.com; ² Uzhgorod national University, Voloshin st., 32, Uzhgorod, 88000 Ukraine, e-mail: kurtyak@bk.ru; ³ Biology Department of V.N. Karazins` Kharkiv National University, Svobody sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine, e-mail: d_sh@list.ru; ⁴ Biology Institute of V.N. Karazins` Kharkiv National University, Svobody sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine, e-mail: alexey_korshunov@list.ru.

Введение

Целью нашего исследования была оценка эволюционно-генетических эффектов такого необычного способа воспроизводства, как полуклональное наследование. В настоящее время существует множество фактов, указывающих на первостепенное эволюционное значение рекомбинации при половом процессе [1, 2]. Мейотическое деление (включающее кроссинговер) является основным фактором, порождающим и/или поддерживающим генетическую изменчивость. Последняя является материальной основой эволюционного потенциала. Таким образом, биологические таксоны, воспроизводящиеся без нормального мейоза, являются весьма перспективной моделью для оценки эволюционных преимуществ полового размножения. Снижение уровня наследственной изменчивости в случае об-

наружения его у асексуальных форм может быть критерием утраты эволюционного потенциала. Одним из вариантов воспроизводства без рекомбинации является полуклональное размножение, известное к настоящему времени для межвидовых гибридов у некоторых насекомых [3], рыб [4, 5], а также и для зеленых лягушек рода *Rana* [6]. Суть полуклонального воспроизводства состоит в наследовании лишь одного из родительских геномов. Гибридный генотип потомства в каждом поколении воссоздается заново за счет возвратных скрещиваний с родительским видом, чей геном не наследуется. Поэтому фактически наследуются гаплоидные генотипы одного из родительских видов. Сравнение уровня изменчивости наследуемого генома в норме и при полуклональном воспроизводстве позволит оценить

скорость потери изменчивости в отсутствие нормального полового процесса, сопровождающего генетической рекомбинацией.

Съедобная лягушка *Rana kl. esculenta* была выбрана нами в качестве объекта для проведения подобного исследования. Известно, что съедобная лягушка является гибридом между прудовой *Rana lessonae* и озерной *Rana ridibunda* лягушками [7]. Характерной особенностью *Rana kl. esculenta* является как раз полуклональное наследование, при котором наследуется лишь один целостный родительский геном (в данном случае в этой роли выступает геном озерной лягушки) [8]. Рекомбинация родительских геномов у *Rana kl. esculenta* происходит лишь в популяциях бассейна Днепра и затрагивает преимущественно ген *Ldh-B* [9]. Эта особенность позволяет выделить внутри гибридной формы особей, гибридных по всем диагностическим генам (в том числе и гибридов F1), и рекомбинантов (заведомо не являющихся гибридами F1). Таким образом можно не только оценить ожидаемое снижение уровня генетической изменчивости у гибридов в целом, но и степень ее снижения в ходе многократного полуклонального воспроизводства.

Материалы и методы

Нами были проанализированы 65 выборок зеленых лягушек из 4 разных водосборных бассейнов Украины (Тиса, Днестр, Днепр и Северский Донец). Локализация выборок показана на рис. 1. Выборки объемом менее 5 животных не анализировались. Лягушки живьем перевозились в лабораторию, где анестезировались и умерщвлялись для приготовления проб. Методика приготовления проб и проведения электрофореза была описана ранее [10]. Видовой состав каждой выборки был описан с использованием традиционных обозначений. Так, сокращение LER обозначало выборку, состоящую из трех генетических форм: *R. lessonae* (L), *R. kl. esculenta* (E) и *R. ridibunda* (R) и т.д. Идентификация видовой принадлежности была проведена на основе электрофоретического анализа диагностических генов. Были проанализированы гены, диагностичность которых известна: гены, кодирующие В-субъединицу лактатдегидрогеназы (*Ldh-B*), митохондриальную форму аспартатаминотрансферазы (*mAat*), альбумин (*Alb*), эстеразу (*Es-5*) [10]. В качестве меры уровня наследственной изменчивости была выбрана ожидаемая гетерозиготность (Нехр). Для вычисления ожидаемой гетерозиготности был использован ген *Ldh-B* по причине легкой идентификации генотипов и высокого уровня полиморфизма в украинских популяциях *Rana ridibunda* [11]. Аллотриплоиды, обнаруженные в бассейне Северского Донца как ранее

[12], так и в ходе выполнения данного исследования, не учитывались.

Результаты

Видовой состав гибридных популяций. Популяции E-типа обнаружены только в бассейне Тисы (Закарпатье). Популяции, содержащие оба родительских вида (LER), найдены в бассейнах Днестра и Днепра. Популяции LE-типа отсутствуют в бассейне Северского Донца, а популяции ER-типа распространены повсеместно (табл. 1).

Генетические формы зеленых лягушек. Гибридные лягушки представлены двумя генотипическими классами (табл. 1). Во-первых, во всех водосборных бассейнах обитают лягушки, гибридные по всем диагностическим генам (гибриды-аллодиплоиды). Во-вторых, только в бассейне Днепра обнаружены особи, гибридные по всем диагностическим генам, кроме *Ldh-B* (гибриды-рекомбинанты).

Уровень генетической изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки у разных генетических форм. Различия уровня изменчивости гена *Ldh-B* между генетическими формами достоверны (рис. 2). Нехр для озерной лягушки равна $0,371 \pm 0,011$, для аллодиплоидов $0,286 \pm 0,016$ и для рекомбинантов всего $0,028 \pm 0,014$, т.е. значения ожидаемой гетерозиготности соотносятся как 13 : 10 : 1 ($P < 0,001$).

Уровень генетической изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки в разных водосборных бассейнах. Значения ожидаемой гетерозиготности гена *Ldh-B* у аллодиплоидов обнаруживают межбассейновые различия (рис. 3): Нехр низка в популяциях бассейнов Тисы, Днестра и Днепра ($0,14-0,25$) и достоверно выше в популяциях Северского Донца ($0,55$) ($P < 0,01$). В популяциях из этого бассейна значения Нехр для аллодиплоидов ($0,55 \pm 0,11$) и озерной лягушки ($0,60 \pm 0,03$) не показывают различий. В прочих водосборных бассейнах значения этого показателя достоверно ($P < 0,001$) ниже для аллодиплоидов, нежели для озерной лягушки.

Уровень генетической изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки в популяциях разных типов. Уровень изменчивости гена *Ldh-B* у аллодиплоидов зависит от наличия в популяции особей родительского вида (рис. 4). В популяциях, где озерная лягушка отсутствует (E, LE), Нехр ниже ($0,14-0,15$), нежели в популяциях, где озерная лягушка обнаружена (LER, ER) ($0,21-0,29$). При этом различия между популяциями из этих двух групп недостоверны при сравнении E и LER ($F=2,97$, $P > 0,05$). Между E и ER, LE и ER, LE и LER различия достоверны ($P < 0,05-0,001$). В популяциях, содержащих озерную лягушку, Нехр у гибридов достоверно ($P < 0,001$) ниже таковой у родительского вида.

Таблица 1. Значения ожидаемой гетерозиготности гена *Ldh-B Rana ridibunda* у трех генетических форм зеленых лягушек Украины

Тип популяции	Генетическая форма									N
	<i>R. esculenta</i> рекомб.			<i>R. esculenta</i> аллодипл.			<i>Rana ridibunda</i>			
	M	m	n	M	m	n	M	m	n	
Бассейн Тисы										
E	–	–	0	0,15	0,03	197	–	–	0	5
LE	–	–	0	0,04	0,03	44	–	–	0	1
LER	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
ER	–	–	0	0,21	0,06	48	0,46	0,05	100	7
Суммарно	–	–	0	0,14	0,02	289	0,46	0,05	100	13
Бассейн Днестра										
E	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
LE	–	–	0	0,21	0,10	17	–	–	0	2
LER	–	–	0	0,42	0,16	10	0,38	0,24	4	1
ER	–	–	0	0,00	0,00	3	0,63	0,07	52	1
Суммарно	–	–	0	0,25	0,07	37	0,61	0,07	56	4
Бассейн Днепра										
E	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
LE	0,00	0,00	62	0,17	0,03	122	–	–	0	8
LER	0,06	0,03	64	0,21	0,03	254	0,34	0,01	1082	19
ER	0,00	0,00	17	0,28	0,04	117	0,28	0,02	426	15
Суммарно	0,03	0,01	143	0,21	0,02	493	0,32	0,01	1508	42
Бассейн Донца										
E	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
LE	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
LER	–	–	0	–	–	0	–	–	0	0
ER	–	–	0	0,55	0,11	21	0,60	0,03	206	6
Суммарно	–	–	0	0,55	0,11	21	0,60	0,03	206	6
Украина в целом										
E	–	–	0	0,15	0,03	197	–	–	0	5
LE	0,00	0,00	62	0,14	0,03	190	–	–	0	11
LER	0,06	0,03	64	0,21	0,03	264	0,34	0,01	1086	20
ER	0,00	0,00	17	0,29	0,03	189	0,41	0,02	784	29
Суммарно	0,03	0,01	143	0,29	0,02	840	0,37	0,01	1870	65

Примечание: n – число животных, N – количество выборок.

Обсуждение

Уровень генетической изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки у разных генетических форм. Существуют два объяснения снижения уровня изменчивости гена *Ldh-B* у гибридной формы сравнительно с родительским видом. Во-первых, в результате действия отбора возможна селективная

гибель гибридных особей, что приводит к уменьшению генетического разнообразия выживших. Во-вторых, не исключено, что в производстве гибридов участвуют далеко не все особи родительского вида. Точно так же можно объяснить практически нулевую изменчивость гена *Ldh-B* у гибридов-рекомбинантов.



Рис. 1. Локализация выборок зеленых лягушек (объяснение в тексте)

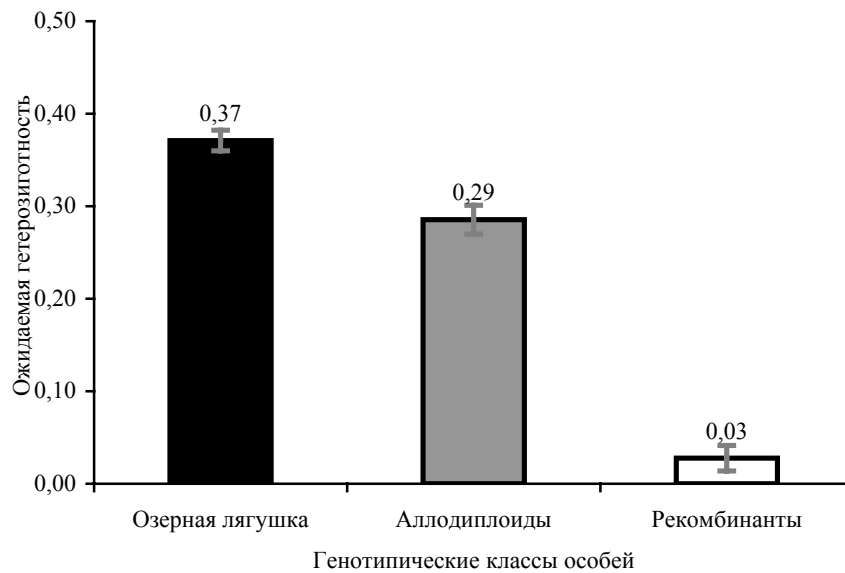


Рис. 2. Уровень изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки в украинских популяциях

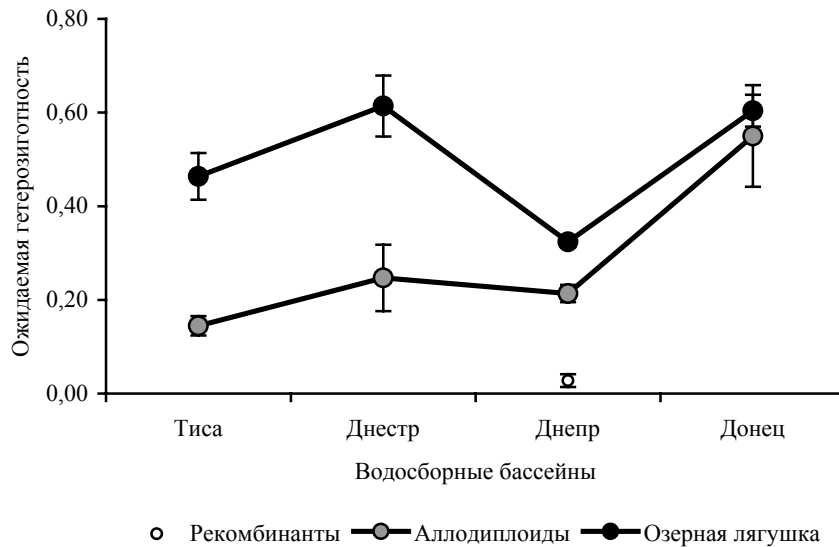


Рис. 3. Уровень наследственной изменчивости гена Ldh-B озерной лягушки в водосборных бассейнах Украины

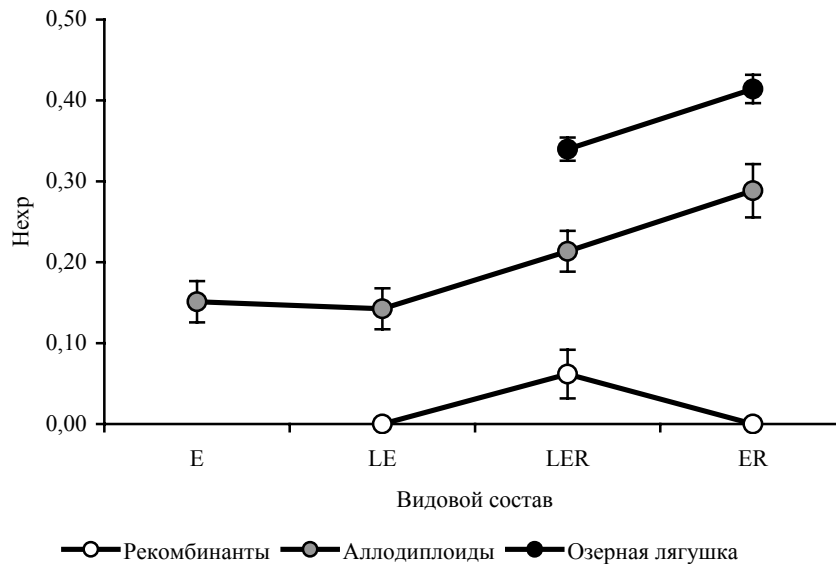


Рис. 4. Ожидаемая гетерозиготность (Hexp) гена Ldh-B озерной лягушки на Украине

Уровень генетической изменчивости гена *Ldh-B* озерной лягушки у разных генетических форм. Различия уровня изменчивости гена *Ldh-B* между генетическими формами достоверны (рис. 2). H_{exp} для озерной лягушки равна $0,371 \pm 0,011$, для аллодиплоидов $0,286 \pm 0,016$ и для рекомбинантов всего $0,028 \pm 0,014$, т.е. значения ожидаемой гетерозиготности соотносятся как 13 : 10 : 1 ($P < 0,001$).

Уровень генетической изменчивости гена *Ldh-B* озерной лягушки в разных водосборных бассейнах. Значения ожидаемой гетерозиготности гена *Ldh-B* у аллодиплоидов обнаруживают межбассейновые различия (рис. 3): H_{exp} низка в популяциях бассейнов Тисы, Днестра и Днепра (0,14-0,25) и достоверно выше в популяциях Северского

Донца (0,55) ($P < 0,01$). В популяциях из этого бассейна значения H_{exp} для аллодиплоидов ($0,55 \pm 0,11$) и озерной лягушки ($0,60 \pm 0,03$) не показывают различий. В прочих водосборных бассейнах значения этого показателя достоверно ($P < 0,001$) ниже для аллодиплоидов, нежели для озерной лягушки.

Уровень изменчивости гена *Ldh-B* у аллодиплоидов зависит от наличия в популяции особей родительского вида (рис. 4).

Уровень генетической изменчивости гена *Ldh-B* озерной лягушки в разных водосборных бассейнах. Сравнение зеленых лягушек из разных бассейнов показывает необычность состава популяционных систем зеленых лягушек в среднем тече-

нии Северского Донца [14], где зарегистрированы как гибриды, полуклонально передающие геном *R. lessonae*, так и триплоидные гибриды.

Уровень генетической изменчивости гена *Ldh-B* озерной лягушки в популяциях разных типов. Анализ количественного видового состава гибридных популяций, проделанный нами ранее [13], показал, что между популяциями E и LE, а также между ER и LER типов не существует достоверных разрывов в частотах генетических форм. Проще говоря, все гибридные популяции зеленых лягушек объективно делятся на две группы: содержащие примесь озерной лягушки и не содержащие ее. Результаты, полученные в ходе выполнения настоящей работы, подтверждают эту гипотезу. В то время как в популяциях LE и E типов гибридизация родительских видов, судя по всему,

не идет (уровень изменчивости гибридной формы относительно низкий), в популяциях LER и ER типов она скорее всего происходит (уровень изменчивости гибридной формы выше).

Выводы

Установлено, что в ходе полуклонального воспроизводства гибридной формы *R. kl. esculenta* в ряду поколений происходит многократное снижение уровня генетической изменчивости родительского генетического материала. Это подтверждает эволюционную значимость рекомбинации в ходе гаметогенеза и свидетельствует о тесной генетической зависимости данной гибридной формы от родительского вида.

1. J. evol. Biol. – 1999, 12. – P. 1003–1167.
2. Biol. J. Lin. Soc. V.79: Issue 1, 2003.
3. Mantovani B., Scali V., Tinti F. Allozyme analysis and phyletic relationships of two new stick-insects from north-west Sicily: *Bacillus grandii benazzii* and *B. rossius –grandii benazzii* (Insecta: Phasmatodea) // J. evol. Biol. – 1991, 4. – P. 279–290.
4. Cunha C., Coelho M. M., Carmona J. A., Doadrio I. Phylogeographical insights into the origins of the *Squalius albumoides* complex via multiple hybridization events // Molecular Ecology. – 2004, 13. – P. 2807–2817.
5. Quattro J. M., Avise J. C., Vrijenhoek R. C. An ancient clonal lineage in the fish genus *Poeciliopsis* (Atheriniformes: Poeciliidae) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – January 1992, Vol. 89. – PP. 348–352, .
6. Vorburger C. Non-hybrid offspring from matings between hemiclinal hybrid waterfrogs suggest occasional recombination between clonal genomes // Ecology Letters. – 2001, 4. – P. 628–636.
7. Бергер Л. Является ли прудовая лягушка *Rana esculenta* complex обыкновенным гибридом? // Экология. – 1976, №2. – С.37–43.
8. 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, V.33. – P.619 – 627.
9. Морозов–Леонов С. Ю. Генетические процессы в гибридных популяциях зеленых лягушек *Rana esculenta* complex Украины. Автореф... дис. канд. биол. наук. Киев. – 1998. – 24 с.
10. Межжерин С. В., Песков В. Н. Биохимическая изменчивость и генетическая дифференциация популяций озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. // Цитология и Генетика. – 1992, Т.26, №1. – С. 43–48.
11. Межжерин С. В., Морозов–Леонов С. Ю., Некрасова О. Д. Естественный перенос ядерных генов в гибридных популяциях зеленых лягушек *Rana esculenta* L., 1758 complex: анализ явления в пространстве и во времени // Генетика. – 2004, Т. 40. № 12. – С. 1364–1370.
12. Borkin L. J., Korshunov A. V., Lada G. A., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Shabanov D. A., Zinenko A. I. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine // Russian Journal of Herpetology. – 2004, V. 11, № 3. – P. 194.
13. Морозов–Леонов С. Ю., Межжерин С. В., Некрасова О. Д., Куртяк Ф. Ф. Гибридные популяции европейских зеленых лягушек: обзор данных по количественному генетическому составу // Успехи совр. биол. – том 127, № 1, Январь–Февраль 2007. — С. 97–105.
14. Шабанов Д. А., Зиненко А. И., Коршунов А. В., Кравченко М. А., Мазепа Г. А. Изучение популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) в Харьковской области: история, современное состояние и перспективы // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006., Випуск 3 (729). – С. 208–220.

Отримано: 15 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 1 квітня 2007 р.