

УДК 575.1:597.822

АНАЛИЗ ТРАНСЕКТЫ ГИБРИДНОЙ ЗОНЫ КРАСНОБРЮХОЙ (*BOMBINA BOMBINA*) И ЖЕЛТОБРЮХОЙ (*BOMBINA VARIEGATA*) ЖЕРЛЯНОК В ПРИКАРПАТЬЕ

А. В. Янчуков, С. В. Межжерин, С. Ю. Морозов-Леонов

Институт зоологии НАН Украины, ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев-30, ГСП, 01601 Украина

Получено 21 января 2001

Анализ трансекты гибридной зоны краснобрюхой (*Bombina bombina*) и желтобрюхой (*Bombina variegata*) жерлянок в Прикарпатье. Янчуков А. В., Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю. — В результате исследования гибридной зоны жерлянок в Прикарпатье показано ее принципиальное соответствие модели интрогрессивной гибридизации парапатрических таксонов. Проведенный комплексный анализ зоны по генным маркерам и ряду морфологических признаков показал высокую степень корреляции пятнистости брюха с гибридным индексом, что позволяет в будущем использовать этот полигенный признак в качестве надежного показателя генных интрогрессий.

Ключевые слова: гибридная зона, генные маркеры, морфологические признаки, жерлянки.

Analysis of the Hybrid Zone between Fire-Bellied (*Bombina bombina*) and Yellow-Bellied (*Bombina variegata*) Toads in Pre-Carpathian. Yanchukov A. W., Mezherin S. V., Morozov-Leonov S. Yu. — In result of the toads hybrid zone study in Pre-Carpathian, its principal correspondence to the model of introgressive hybridization of the parapatric taxa is shown. The complex analysis of the zone undertaken, by the genetic markers and the morphological traits, has shown the high correlation degree of the hybrid and the belly-spot indexes. The last allows for using this polygenic trait as the proved indicator of the gene introgressions.

Key words: hybrid zone, genetic markers, morphological traits, fire-bellied toads.

Введение

Жерлянки рода *Bombina* Oken, 1816 семейства круглоязычных (Discoglossidae) являются модельным объектом эволюционно-генетических исследований наземных позвоночных Европы. Этот комплекс состоит из двух политипических видов: краснобрюхой *Bombina bombina* (L., 1761) и желтобрюхой *Bombina variegata* (L., 1758) жерлянок. Ареал краснобрюхой жерлянки охватывает большую часть Восточно-европейской равнины от предгорий Карпат до бассейна реки Урал, а желтобрюхая жерлянка распространена в Центральной и Южной Европе и приурочена к горной местности, обитая на высоте 400–1600 м. В предгорьях Карпат и Балкан на высоте 200–400 м краснобрюхая и желтобрюхая жерлянки образуют зону парапатрии, в которой происходит интрогрессивная гибридизация (Щербак, Щербань, 1980; Horbulewicz, 1927; Gollmann, 1988; Szymura, 1993; Khalturin et al., 1996; MacCallum et al., 1998). Главная особенность гибридной зоны, образуемой жерлянками, — это ее двуслойность. Это значит, что в местах перекрывания ареалов двух видов жерлянок может быть выделено 2 области генетических контактов: собственно гибридная зона и зона генных интрогрессий.

Гибридная зона жерлянок — это область, где на протяжении многих десятков поколений происходит гибридизация. Ее ширина обычно не превышает несколько сотен метров, и она располагается на высоте 250–300 м. Популяции жерлянок этой зоны состоят из гибридных особей, у которых большей частью наблюдается равное соотношение геномов родительских видов и могут одновременно встречаться родительские виды и гибриды. Считается, что население этой зоны формируется во многом за счет мигрирующих особей родительских видов. Отсюда возникает вопрос о генетических и экологических факторах, делающих эту зону стабильной во времени. Ведь имеющиеся данные позволяют считать, что география гибридных зон в Прикарпатье оставалась неизменной, по крайней мере, на протяжении 70 лет со времени первого исследования (Horbulewicz, 1927).

Зона генных интрогрессий, которую можно еще назвать «буферной зоной», она как бы окружает узкую гибридную зону и имеет ширину до 20 км. На всем ее протяжении встречаются жерлянки с той или иной степенью генных примесей от альтернативного вида, и гибридизация видов здесь не происходит.

Эта многоуровневость гибридной зоны жерлянок может быть выявлена с помощью генных маркеров, поскольку традиционные морфологические признаки не дают достаточной разрешающей способности в диагностике видов и гибридов. Отсюда тонкое структурирование зоны на уровне фенотипа проблематично. Так, к примеру, в Восточных Карпатах особи с признаками краснобрюхой жерлянки встречаются даже на высоте более 1000 м (Щербак, Щербань, 1980). Поэтому целью настоящей публикации был комплексный анализ структуры гибридной зоны, основанный на первичном анализе на уровне генных маркеров, с последующим на основе изменчивости диагностических морфологических признаков.

Материал и методы

Материалом для данного исследования послужила серия из 19 выборок жерлянок (№ 1–16, 18–20), представляющая собой трансекту шириной 15 км, которая как бы рассекает зону парапатрии видов неподалеку от г. Стрый Львовской обл. В качестве контроля использована выборка (№ 17) краснобрюхой жерлянки, собранная в 30 км от гибридной зоны из окр. с. Бильче Львовской обл.

Морфометрический анализ жерлянок из гибридной зоны проводился по следующим признакам: 1) характеру пятнистости брюха, оцененному по стандартизированной схеме (Nurnberger et al., 1995); 2) относительной длине конечностей (бедро (L./F.) и голени (L./T.)); и 3) относительной ширине головы (L. с./Лт. с.).

Электрофоретический анализ осуществлялся в 7,5%-ном полиакриламидном геле в двух буферных системах: непрерывной (Peacock et al., 1965) и прерывистой (Davis, 1964). В непрерывной буферной системе изучены ферменты с четвертичной структурой: аспаратаминотрансфераза (Aat), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Gpd), глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (G3pdh), изоцитратдегидрогеназа (Idh), креатинкиназа (Ck), ксантиндегидрогеназа (Xdh), лактатдегидрогеназа (Ldh), малатдегидрогеназа (Mdh), малик энзим (Me), пептидаза (Pep), сорбитолдегидрогеназа (Sdh), супероксиддисмутаза (Sod), фосфоглюконатдегидрогеназа (Pgdh). В прерывистой буферной системе исследованы: эстеразы (Es), фосфоглюкомутаза (Pgm), белки крови (Alb, Tf) и структурные белки мышц (Pt).

Результаты

Электрофоретический анализ выборки ферментов и белков позволил идентифицировать 27 локусов: Aat-1, Aat-2, Alb, Ck-1, Ck-2, Es-1, Es-2, Es-3, Es-4, Gpd, G3pd, Hb-1, Hb-2, Idh-1, Idh-2, Ldh-A, Ldh-B, Mdh-1, Me-1, Pep-1, Pep-2, Pgdh, Pgm, Pt-1, Pt-2, Pt-3, Pt-4. Фиксированные генные различия между двумя видами отмечены для 6 локусов: Ldh-B, Mdh-1, Es-1, -4, Ck-1, -2. При этом по локусам Es-1, -4 и Ck-1, -2 не всегда удается однозначно идентифицировать гибридные гетерозиготы из-за того, что разные аллели и продукты локусов перекрываются. Поэтому для диагностики гибридов и определения генетической структуры популяций из зоны парапатрии использованы только два локуса Ldh-B и Mdh-1.

В таблице 1 и на рисунке 1 представлено распределение ряда параметров в выборках из гибридной зоны, на основании изменчивости которых можно судить о структуре трансекты и характере гибридизации, протекающей в этой зоне.

Генетическая структура населения трансекты. Анализ выборок проводился как по отдельным локусам, так и по обобщающей характеристике — гибриднему индексу, который является строгим показателем представленности генома каждого из родительских видов в гибридных популяциях. В целом сопряженность изменчивости генных маркеров и гибридного индекса очень высока (табл. 2). Значение коэффициента корреляции между изменчивостью частот аллелей локусов Ldh-B и Mdh-1 на средневыворочном уровне составило 0,72 ($p < 0,001$), а между отдельными локусами и гибридным индексом еще выше ($r = 0,92$; $p < 0,001$). Такая степень корреляции позволяет в дальнейшем при анализе гибридной зоны использовать только один обобщающий признак.

Обсуждение

Характеризуя зону парапатрии двух видов жерлянок, можно сделать следующие обобщения.

1. На протяжении трансекты генетически однородные популяции жерлянок отсутствуют и во всех выборках есть та или иная примесь генов от альтернатив-

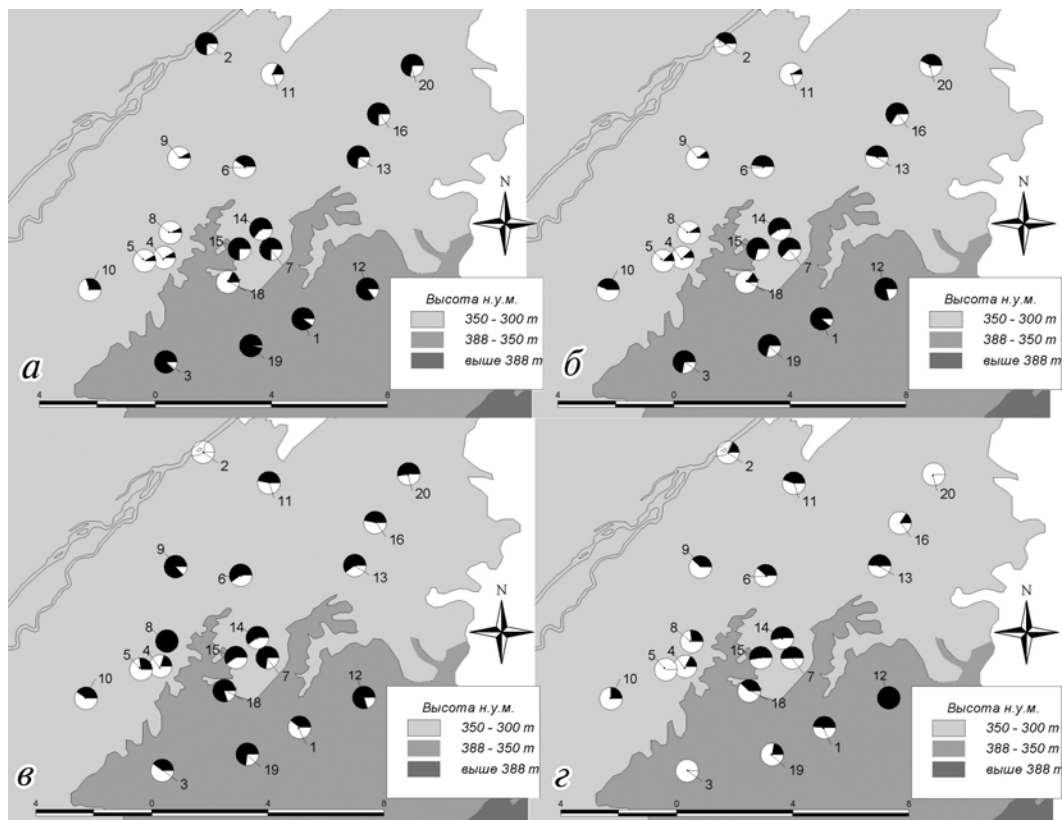


Рис. 1. Схема размещения генных интрогрессий в области парапатрии краснобрюхой *B. bombina* и желтобрюхой *B. variegata* жерлянок в Прикарпатье. Степень гибридности популяции оценена: *а* — по гибриднему индексу; *б* — по пятнистости брюха; *в* — по относительной длине голени; *г* — по относительной длине бедра. Белым цветом обозначена доля генома *B. bombina*, а черным — *B. variegata*.

Fig. 1. The map showing the gene introgressions pattern in the zone of parapatry between fire-bellied *B. bombina* and the yellow bellied *B. variegata* toads in Pre-Carpathian. The degree of hybridization was estimated: *a* — by hybrid index; *б* — by spot score; *в* — by relative fibula length; *г* — by relative tibia length. White colored is the *B. bombina* share in the genome and black is *B. variegata*.

ного вида. Отсюда вывод: у жерлянок имеет место типичная интрогрессивная гибридизация, сопровождающаяся возникновением гибридов второго и последующих поколений, что приводит к генным интрогрессиям геномов родительских видов и «диффузии» генов.

2. В более возвышенных местообитаниях, где места размножения жерлянок представлены в основном небольшими временными водоемами, доминируют особи с геномом желтобрюхой жерлянки. На равнинных участках, занимаемых пастбищами и агроценозами, популяции обнаруживают либо близкое к равному соотношению диагностических аллелей, либо преобладают носители генов краснобрюхой жерлянки.

3. Наряду с относительно широкой зоной генных интрогрессий, простирающейся не менее чем на 15 км, имеется и узкая переходная зона между *B. bombina* и *B. variegata*, которую и следует называть гибридной зоной. Именно здесь (выборки № 6, 7, 14, 15, 20) встречаются особи, несущие поровну геномы обоих видов. Ширина этой зоны не более 1 км.

В порядке обсуждения следует отметить, что на фоне общей тенденции выделяется выборка № 2 из русла р. Стрый, в которой преобладают особи с генами от *B. variegata*, хотя она и располагается в зоне *B. bombina*. Причиной этого

может быть постоянная иммиграция желтобрюхих жерлянок вниз по течению реки в зону доминирования краснобрюхих.

Таким образом, генетическая структура зоны перекрытия ареалов желтобрюхой и краснобрюхой соответствует описанию областей гибридизации этих видов и особенно в Польше близ Кракова и Пшемьсля (Szymura, Barton, 1991)

Изменчивость морфологических признаков в зоне трансекты. Проведенный корреляционный анализ между гибридным индексом и рядом морфологических показателей, диагностирующих жерлянок, показал, что в наибольшей степени генные маркеры сопряжены с изменчивостью характера пятнистости брюха (табл. 2). Значение коэффициента корреляции между пятнистостью брюха и гибридным индексом составило 0,86, что ненамного ниже, чем между индексом и генными маркерами непосредственно (табл. 2). Промеры конечностей коррелировали с генетическими показателями значительно слабее ($r = 0,56$; $p < 0,05$), а индекс отражающий относительную ширину головы во-

Таблица 1. Изменчивость ряда параметров в гибридных популяциях жерлянок Прикарпатья

Table 1. The variability of several traits within the fire-bellied toads hybrid zone in Pre-Carpathian

№	n	Высота, м	Q _{var}		H _{Ind}	Sp	L./T.	L./F.	L. с./Lt. с.
			Q _{Ldh-B}	Q _{Mdh-1}					
1	16	360	0,06	0,09	0,87	0,89	2,90	2,66	0,90
2	7	250	0,71	0,64	0,68	0,41	2,78	2,56	0,85
3	13	395	0,85	1,00	0,92	0,72	2,78	2,46	0,91
4	12	320	0,08	0,08	0,08	0,12	3,15	2,73	0,91
5	10	320	0	0,14	0,07	0,12	3,18	2,82	0,98
6	15	340	0,30	0,53	0,42	0,48	3,09	2,89	0,95
7	6	300	0,92	0,58	0,75	0,63	2,85	2,55	0,91
8	13	320	0,12	0	0,06	0,09	2,98	2,61	1,01
9	12	315	0,04	0,21	0,13	0,11	2,98	2,68	0,96
10	12	330	0,29	0,21	0,25	0,44	3,01	2,75	0,95
11	12	300	0,21	0,17	0,19	0,08	2,86	2,67	0,93
12	10	355	0,85	0,90	0,88	0,79	2,85	2,74	0,93
13	14	330	0,88	0,77	0,84	0,47	2,70	2,70	0,90
14	13	340	0,54	0,62	0,58	0,60	2,61	2,55	0,91
15	7	320	0,79	0,70	0,75	0,71	2,68	2,50	0,98
16	10	330	0,65	0,85	0,72	0,66	2,78	2,54	0,95
17*	10	210	0	0	0	0,06	3,14	2,86	0,98
18	11	330	0,09	0,23	0,16	0,15	2,86	2,72	0,97
19	12	330	0,92	1,00	0,95	0,71	2,67	2,46	0,93
20	5	310	0,50	0,60	0,55	0,43	3,03	2,78	0,92

* Контрольная выборка. Условные обозначения: Q_{var} — частота генов желтобрюхой жерлянки; H_{Ind} — гибридный индекс; Sp — пятнистость брюха; L./T. — относительная длина голени; L./F. — относительная длина бедра; L. с./Lt. с. — относительная ширина головы.

Таблица 2. Матрица корреляций между параметрами популяций, указывающими на гибридизацию жерлянок: на уровне отдельных особей (выше диагонали) и на уровне отдельных выборок (ниже диагонали)

Table 2. The correlation matrix between the population parameters, that indicates the toads' hybridization: across the individuals (above the diagonal) and across the samples (below the diagonal)

Показатель	L./T.	L./F.	L. с./Lt. с.	Sp	Q _{LDH}	Q _{MDH}	H _{Ind}
L./T.		0,67	0,11	0,42	0,32	0,40	0,36
L./F.	0,80		0,21	0,33	0,26	0,34	0,30
L. с./Lt. с.	0,36	0,28		0,28	0,36	0,35	0,36
Sp	0,61	0,52	0,42		0,71	0,75	0,72
Q _{Ldh}	0,75	0,64	0,54	0,88		0,72	0,84
Q _{Mdh}	0,70	0,57	0,50	0,90	0,92		0,88
H _{Ind}	0,72	0,60	0,52	0,89	0,96	0,96	

Условные обозначения те же, что и для таблицы 1.

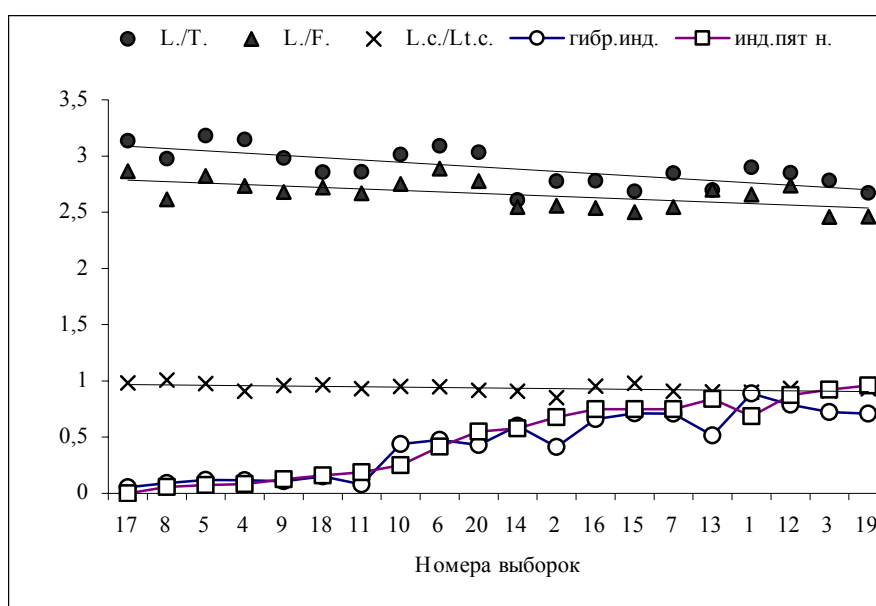


Рис. 2. Тренды показателей гибридизации в выборках из зоны парапатрии жерлянок, ранжированных по гибриднему индексу.

Fig. 2. The trends of the hybridization indexes across samples in the zone of the toads parapathy, placed as the hybrid index increases.

обще не коррелировал ($r = 0,5$; $p > 0,05$). Неслучайно картина гибридной зоны, построенная по характеру пятнистости, выглядит так же как и по генным маркерам (рис. 1, а, б), тогда как построенная по длине конечностей, кажется менее четкой (рис. 1, в, г)

Разная степень сопряженности морфологических признаков с генотипической структурой особей отображена графически в виде тренда изменчивости показателей вдоль трансекты (рис. 2). Самые резкие изменения значений вдоль трансекты, как и следовало ожидать, дают 2 показателя: гибридный индекс и индекс пятнистости брюха. Таким образом, анализ структуры зоны парапатрии *B. variegata* и *B. bombina* в Прикарпатье показал соответствие данной зоны модели интродуктивной гибридизации парапатрических таксонов, а также зонам гибридизации этих видов, описанных ранее из Австрии (Gollmann, 1988), Польши (Szymura, Barton, 1991) и Хорватии (MacCallum et al., 1998). Тем не менее, имеется ряд особенностей, отличающих эту зону от уже описанных и делающих ее перспективной моделью для дальнейших исследований.

Во-первых, в Прикарпатье есть резкое разграничение двух гибридизирующих видов, что обусловлено достаточно контрастным переходом от горной лесистой местности к открытой равнине. Такая картина не может быть получена в холмистых ландшафтах с мозаичной структурой поселений жерлянок, когда популяции *B. variegata* чередуются с *B. bombina* (MacCallum et al., 1998).

Во-вторых, на равнине Прикарпатье все еще достаточно многочисленна краснобрюхая жерлянка, плотность поселений которой во многих местах Центральной Европы значительно уменьшилась.

В-третьих, в Прикарпатье, являющимся самым восточным пределом гибридизации жерлянок, встречаются наиболее контрастные в генетическом отношении формы *B. variegata* и *B. bombina* — ведь вследствие изолированности краснобрюхой жерлянки в Придунайской низменности считается, что она здесь может частично содержать примеси генов и от *B. variegata*.

Важным перспективным направлением исследований гибридизации жерлянок следует считать анализ причин и факторов, ограничивающих проникновение (диффузию) отдельных генов одного вида в геном другого, но уже вне узкой зоны гибридизации. Ясно, что если гибридизация происходит на протяжении тысячелетий, то интрогрессировавшие гены за столь продолжительный период должны распространиться по ареалу другого родительского вида далеко от зоны парапатрии. Например, при интенсивной миграции желтобрюхой жерлянки по течению горных рек на равнину Прикарпатья гены *B. variegata* должны были давно уже проникнуть в популяции краснобрюхой жерлянки на многие сотни километров от места гибридизации. Однако этого не происходит. Как показал предварительный анализ (табл. 1), уже в 30 км от зоны встречаются только генетически чистые *B. bombina* без всякой примеси генов от *B. variegata*. Следовательно, существуют барьеры, ограничивающие генные потоки. Хотя и не исключено, что ограничения касаются только потока ядерных генов, кодирующих ферменты, а активное движение регуляторных элементов ничем не ограничено. Ведь, например, в комплексе зеленых лягушек *R. esculenta* процесс генной диффузии ядерных генов ограничен только Приднепровьем (Межжерин, Морозов-Леонов, 1997), а в других местах происходит только свободный переход элементов митохондриальной ДНК (Spolsky, Uzzell, 1984; 1986), которые выполняют в геноме регуляторную функцию.

Можно ожидать, что на вопрос об интрогрессиях регуляторных элементов позволит ответить анализ изменчивости полигенных морфологических признаков. Конкретно это может быть пятнистость брюха — признак, как выяснилось, весьма тесно сопряженный с изменчивостью генных маркеров, в формировании которого важную роль играют генные регуляции.

Материалы данной статьи доложены на конференции молодых исследователей (Киев : Ин-т зоологии НАН Украины, апрель, 2002).

- Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю. Диффузии генов в гибридных популяциях зеленых лягушек *Rana esculenta* L., 1758 complex (Amphibia, Ranidae) Приднепровья // Генетика. — 1997. — 33, № 3. — С. 358–364.
- Щербак Н. Н., Щербань М. И. Земноводные и пресмыкающиеся Украинских Карпат. — Киев : Наук. думка, 1980. — С. 91–109.
- Davis D. J. Disc-electrophoresis. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — 121. — P. 404–427.
- Gollmann G. Wien am Schnittpunkt grosser Lebensraume: Hybridzonen bei Amphibien // Stapfia. — 1988. — 51. — P. 67–72.
- Horbulewicz M. L. Die Verbreitung der Bombinator- und Triton-Arten im Bereiche der Bezirke Sambor, Drohobycz, Stryj (Kleinproten) // Bull. Acad. Polon. Sci. Lett. Cracowie. — 1927. — P. 87–112.
- Khalturin M. D., Borkin I. L., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M. Hybridization between *Bombina bombina* and *Bombina variegata* in the Ukrainian Transcarpathians: electrophoretic and genome size data // IV Ogolnopolska Konf. Herpetolog. — 1996. — P. 45–46.
- MacCallum C. J., Nurnberger B. D., Barton N. H., Szymura J. M. Habitat preference in the *Bombina* hybrid zone in Croatia // Evolution. — 1998. — 52, N 1. — P. 227–239.
- Nurnberger B. D., Barton N. H., MacCallum C. et al. Natural selection on quantitative traits in the *Bombina* hybrid zone // Evolution. — 1995. — 49, N 4. — P. 1224–1238.
- Peacock A. C., Bunting S. L., Queen K. G. Serum protein electrophoresis in acrilamide gel patterns from normal human subject // Science. — 1965. — 147. — P. 1451–1455.
- Szymura J. M. Analysis of hybrid zone with *Bombina* // Hybrid zones and the evolutionary process. — Oxford : Univ. Press., 1993. — P. 261–289.
- Spolsky C., Uzzell Th. Natural inetspecies transfer of mitochondrial DNA in Amphibians // Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). — 1984. — 81. — P. 5802–5805.
- Spolsky C., Uzzell Th. Evolutionary history of the hybridogenetic hybrid frog *Rana esculenta* as deduced from mtDNA analyses // Mol. Biol. Evol. — 1986. — 3, N 1. — P. 44–56.
- Szymura J. M., Barton N. H. The genetic structure of the hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*: comparisions between transects and between loci // Evolution. — 1991. — 45, N 1. — P. 237–261.