

УДК: 576.316.23: 597.851

Изменчивость размеров районов ядрышковых организаторов в кариотипах зеленых лягушек

О.В.Бірюк¹, Ю.М.Розанов², С.Н.Литвинчук², Р.А.Пасынкова²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург, Россия)
tykhailova.o.v@gmail.com

Поиск видоспецифичных маркеров на хромосомах озерной *Pelophylax ridibundus* и прудовой лягушек *P. lessonae* является актуальной задачей для изучения цитогенетических механизмов гемиклонального наследования на примере их гибрида *P. esculentus*. В работе применен метод Ag-окрашивания. Изучена изменчивость размеров района ядрышкового организатора (ЯОР) у 65 особей родительских видов и гибридов из 22 локалитетов. Измерения не показали значимых отличий в относительной длине ЯОР на хромосомах родительских видов. Предположение о том, что у гибридов ЯОРы асимметричнее по относительной длине, чем у родительских видов, также не подтвердилось. Сделан вывод о том, что длина ЯОР не может служить надежным видоспецифичным маркером. Выявлены случаи удвоения ЯОР, а также отклонения от нормального количества ЯОР в кариотипе гибридов.

Ключевые слова: ядрышковый организатор, *Pelophylax esculentus* complex, кариотип, триплоидия.

Мінливість розмірів районів ядерцевих організаторів у кариотипах зелених жаб

О.В.Бірюк, Ю.М.Розанов, С.М.Литвинчук, Р.А.Пасинкова

Пошук видоспецифічних маркерів на хромосомах озерної *P. ridibundus* та ставкової жаб *P. lessonae* є актуальним завданням для цілей вивчення цитогенетичних механізмів геміклонального успадкування на прикладі їх гібрида *P. esculentus*. У даній роботі було застосовано метод Ag-зabarвлення. Вивчено мінливість розмірів району ядерцевого організатора (ЯОР) у 65 особин батьківських видів та гібридів із 22 локалітетів. Виміри не показали значущих відмінностей у відносній довжині ЯОР на хромосомах батьківських видів. Припущення про те, що у гібридів ЯОРи більш асиметричні за відносною довжиною, ніж у батьківських видів, теж не підтвердилось. Було зроблено висновок про те, що довжина ЯОР не може служити надійним видоспецифічним маркером. Зареєстровані випадки подвоєння, а також відхилення від нормальної кількості ЯОР у кариотипах гібридів.

Ключові слова: ядерцевий організатор, *Pelophylax esculentus* complex, кариотип, триплоїдія.

Variability of nucleolus organizer region sizes in green frog karyotypes

O.V.Biriuk, J.M.Rosanol, S.N.Litvinchuk, R.A.Pasynkova

Search for species-specific markers on chromosomes of the lake (*Pelophylax ridibundus*) and the pond (*P. lessonae*) frogs is an actual problem to study the cytogenetic mechanisms of hemiclinal inheritance in hybrid frog, *P. esculentus*. In this paper the method of Ag-staining was used. The variability of nucleolus organizer region (NOR) sizes in 65 individuals of parental species and hybrids from 22 localities was studied. We found no significant differences in the relative length of NORs on parental species chromosomes. We also assumed that NOR relative length in hybrids is more asymmetrical if compared with parental species. This suggestion was not confirmed as well. Therefore we concluded that the length of NOR cannot be used as reliable species-specific marker. Cases of NOR doubling and deviations from the normal number of NORs in hybrid karyotypes were recorded.

Key words: nucleolus organizer, *Pelophylax esculentus* complex, karyotype, triploidy.

Введение

В 1964 г. было обнаружено, что съедобная лягушка *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), которую со времен Линнея считали полноценным видом, является результатом межвидовой гибридизации между прудовой лягушкой *P. lessonae* (Camerano, 1882) и озерной лягушкой *P. ridibundus* (Pallas, 1771) (Berger, 1964). Гибридные лягушки *P. esculentus* фертильны. Благодаря специфическим цитогенетическим изменениям в гаметогенезе они передают в гаметы геном одного из родителей без

изменений, т.е. клонально, минуя процесс рекомбинации (Tunner, 1974; Tunner, Heppich-Tunner, 1991).

Кариотипы зеленых лягушек изучались, начиная с первой половины XX века. Примерно в это время были впервые обнаружены и описаны триплоидные особи (Wickbom, 1945). Зеленые лягушки, которых сейчас относят к роду *Pelophylax* (Frost et al., 2006), в двойном наборе несут 26 хромосом: 5 пар больших и 8 пар маленьких. Хромосомы относятся к метацентрическому и субметацентрическому типу (Schmid, 1978; Сурядная, 2003). После открытия гибридного происхождения съедобной лягушки стала актуальной проблема поиска различий между хромосомами родительских видов. Отличая родительские геномы в клетках гибрида, можно детально изучать цитогенетические процессы, происходящие в их гаметогенезе, понимать, на каком этапе и какой из геномов удаляется или удваивается у той или иной формы гибридов в той или иной гемиклональной популяционной системе (Шабанов и др., 2009). Однако большинство авторов сходятся на том, что хромосомы *P. lessonae* и *P. ridibundus* нельзя отличить по их внешней морфологии, используя только рутинное окрашивание, так как хромосомы-ортологи имеют сходную длину и центромерный индекс (Günther, 1970; Plotner, Klinkhardt, 1992) (рис. 1). В связи с этим для решения проблемы определения родительских геномов исследователи начали применять различные дифференциальные окрашивания. Применение С-бэндинга на соматических метафазных пластинках позволило получить первое цитологическое доказательство того, что *P. esculentus* является гибридом (Heppich, 1978). Определенный успех на отдельных популяциях имело также применение двойного окрашивания флуоресцентными красителями Actinomycin D/33258 Hoechst (Heppich et al., 1982; Tunner, Heppich-Tunner, 1991). Интересные данные, касающиеся кариотипов зеленых лягушек, были получены также методом BrdU-Hoechst-Giemsa бэндинга (Schempp, Schmid, 1981). В последние годы для дифференциации геномов *P. ridibundus* и *P. lessonae* стали применять молекулярные методики: флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) и даже геномную *in situ* гибридизацию (GISH) (Ragghianti et al., 2007; Marracci, Ragghianti, 2008; Zalesna et al., 2011; Dedukh et al., 2015). Однако в литературе отсутствуют данные по изменчивости у группы зеленых лягушек (*P. esculentus* complex) такого просто выявляемого участка генома, как ядрышковый организатор (ЯОР). Ag-окрашивание ранее применялось лишь для выявления локализации ЯОР, при описании кариотипов (Schmid, 1982; Birstein, 1984; Schmid et al., 1995). У большинства видов рода *Pelophylax* ЯОР локализован на длинном плече одной из малых хромосом, однако по различным источникам эту хромосому помещают на кариограммах под номерами 9, 10 и даже 11 (Heppich, 1978; Plotner, Klinkhardt, 1992; Miura, 1995; Сурядная, 2003; Кайбелева и др., 2004; Манило и др., 2007). В данной работе мы считаем ЯОР-несущими хромосомами 9-ю пару гомологов.

На предварительном этапе нашего исследования было отмечено, что при окрашивании кариотипов нитратом серебра (AgNO_3) у некоторых особей *P. lessonae* и *P. ridibundus* явно выражена разница по длине ЯОРов (рис. 1). Мы выдвинули гипотезу, что в геномах прудовой лягушки ЯОР имеет заметно большую длину, чем у озерной лягушки. Чтобы проверить эту гипотезу, мы поставили цель оценить изменчивость района ядрышкового организатора в кариотипах родительских видов и гибридов. Такая оценка даст возможность понять, может ли ЯОР служить видоспецифичным хромосомным маркером.

Материалы и методы

Лягушки были отловлены в течение полевых сезонов 2009–2014 г. в 22 локалитетах на территории Украины, Российской Федерации, Молдавии, Болгарии, Хорватии и Турции. Всего проанализировано 121 метафазные пластинки (65 особей). Для измерений были выбраны 45 пластинок, полученных при изучении 22 особей: 7 – *P. ridibundus*, 5 – *P. lessonae* и 10 – *P. esculentus*, из которых 6 триплоидов и 4 диплоида. Кроме того, для качественной оценки использовали кариотипы 43 особей из Харьковской области: 16 – *P. ridibundus*, 27 – *P. esculentus*, из которых 21 диплоид и 6 триплоидов (табл. 1).

Видовая принадлежность и состав геномов 24 особей были определены методом проточной ДНК-цитометрии. Метод основан на различии между родительскими видами по количеству ядерной ДНК в клетках и позволяет не только подтвердить принадлежность особей к видам *P. lessonae* (генотип LL), *P. ridibundus* (генотип RR) или к диплоидной гибридной форме *P. esculentus* (LR), но и определить состав геномов у триплоидных особей (Vinogradov et al., 1990). Триплоидных гибридов, несущих два хромосомных набора *P. lessonae* и один *P. ridibundus*, принято обозначать LLR, а

лягушек с одним геномом *P. lessonae* и двумя *P. ridibundus* – соответственно LRR. Для остальных особей видовая принадлежность определялась по комплексу внешних признаков (Plötner, 2005), а уровень пloidности – по количеству хромосом на кариологических препаратах.

Таблица 1.

Названия локалитетов, координаты, видовая принадлежность, пол, генотипы (LL, RR, LR, LRR в LLR) и пloidность (2n и 3n), количество ядерной ДНК (пикограммы), количество изученных кариотипов (N) и среднее значение относительной длины ЯОР (в процентах от длины 9-й хромосомы)

Вид	Пол	Генотип	Количество ДНК	Область (страна)	Локалитет	Координаты	N	ЯОР, %
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	3	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	3n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	f	3n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	4	
<i>P. esculentus</i>	m	3n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гинеевка	49°41'N 36°26'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Добрик	49°32'N 36°16'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Добрик	49°32'N 36°16'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	3n	-	Харьковская, Украина	Добрик	49°32'N 36°16'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	LR	15,16	Харьковская, Украина	Добрик	49°32'N 36°16'E	2	8
<i>P. esculentus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	4	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	2	
<i>P. esculentus</i>	m	LR	15,20	Херсонская, Украина	Корсунка	46°45'N 33°11'E	1	8
<i>P. esculentus</i>	m	LR	15,02	Молдавия	Мокра	47°38'N 29°09'E	1	7
<i>P. esculentus</i>	m	LRR	22,53	Харьковская, Украина	р. Чепель	49°16'N 36°55'E	5	8
<i>P. esculentus</i>	f	LLR	21,87	Донецкая, Украина	Дробышево	49°01'N 37°41'E	2	10
<i>P. esculentus</i>	m	LLR	21,89	Донецкая, Украина	Дробышево	49°01'N 37°41'E	3	9
<i>P. esculentus</i>	f	LLR	22,22	Донецкая, Украина	Дробышево	49°01'N 37°41'E	2	6
<i>P. esculentus</i>	m	LR	15,08	Днепропетровская, Украина	Николаевка	48°31'N 34°43'E	1	5
<i>P. esculentus</i>	m	LLR	22,02	Харьковская, Украина	Сухая Гомольша	49°32'N 36°20'E	1	10
<i>P. esculentus</i>	m	LR	14,04	Харьковская, Украина	Сухая Гомольша	49°32'N 36°20'E	1	
<i>P. esculentus</i>	m	LRR	23,37	Харьковская, Украина	Сухая Гомольша	49°32'N 36°20'E	1	8
<i>P. esculentus</i>	m	3n	-	Харьковская, Украина	Эсхар	49°47'N 36°35'E	4	
<i>P. esculentus</i>	f	3n	-	Харьковская, Украина	Эсхар	49°47'N 36°35'E	2	
<i>P. esculentus</i>	f	3n	-	Харьковская, Украина	Эсхар	49°47'N 36°35'E	1	
<i>P. lessonae</i>	m	LL	13,82	Марий Эл, Россия	Большая Кокшага	56°39'N 47°15'E	3	11

<i>P. lessonae</i>	m	LL	13,84	Марий Эл, Россия	Большая Кокшага	56°39'N 47°15'E	2	13
<i>P. lessonae</i>	f	LL	13,83	Новгородская, Россия	оз. Соминец	58°35'N 35°11'E	2	7
<i>P. lessonae</i>	f	LL	13,95	Кировоградская, Украина	Черный лес	48°46'N 32°32'E	1	10
<i>P. lessonae</i>	m	LL	14,06	Кировоградская, Украина	Черный лес	48°46'N 32°32'E	3	9
<i>P. ridibundus</i>	m	RR	16,30	Волгоградская, Россия	Большой Еруслан	50°30'N 46°30'E	6	9
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. ridibundus</i>	m	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	3	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Гайдары	49°37'N 36°20'E	2	
<i>P. ridibundus</i>	f	RR	16,17	Болгария	Галемо Буково	42°11'N 27°11'E	1	8
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Дергачи	50°07'N 36°07'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Дергачи	50°07'N 36°07'E	4	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	1	
<i>P. ridibundus</i>	f	2n	-	Харьковская, Украина	Иськов пруд	49°37'N 36°17'E	2	
<i>P. ridibundus</i>	f	RR	16,68	Хорватия	оз. Поникве	45°05'N 14°33'E	1	8
<i>P. ridibundus</i>	f	RR	16,16	Волынская, Украина	оз. Свитязь	51°29'N 23°51'E	1	9
<i>P. ridibundus</i>	f	RR	16,04	Турция	Финике	36°18'N 30°08'E	2	8
<i>P. ridibundus</i>	m	RR	15,30	Харьковская, Украина	Харьков, ул. Клочковская	50°00'N 36°21'E	6	
<i>P. ridibundus</i>	f	RR	16,10	Марий Эл, Россия	оз. Яльчик	56°00'N 48°23'E	3	10
<i>P. ridibundus</i>	m	RR	16,11	Марий Эл, Россия	оз. Яльчик	56°00'N 48°23'E	1	9
Всего пластинок							121	
Всего пластинок <i>P. lessonae</i>							11	
Всего пластинок <i>P. ridibundus</i>							46	
Всего пластинок <i>P. esculentus</i>							64	
Использовано в измерениях <i>P. lessonae</i>							10	
Использовано в измерениях <i>P. ridibundus</i>							14	
Использовано в измерениях <i>P. esculentus</i> 2n							5	
Использовано в измерениях <i>P. esculentus</i> 3n							13	
Всего измерено							42	

Кариологические препараты были приготовлены из кишечника методом раскапывания суспензии клеток на нагретое стекло, а затем окрашены нитратом серебра. Подробное описание методики было опубликовано ранее (Вегерина и др., 2013).

Часть препаратов изучалась с помощью тринокулярного микроскопа Axioscop-DFS360 и фотографировалась с помощью USB-камеры Leica DFC365 FX на базе Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург. Эти более четкие фотографии использовались нами для измерений. Другая часть препаратов была изготовлена и обработана в Харьковском национальном университете имени В.Н.Каразина. Последние мы изучали с помощью микроскопа MicroStar A10 Spencer Optics (American Optical) и фотографировали с помощью USB-камеры TOUPCAM UHCCD05100KPA. Эти фотографии были использованы только для построения рядов гомологов и для оценки общей изменчивости (рис. 4).

На отобранных фотографиях мы находили гомологи 9-й пары хромосом, вырезали и строили ряды из гомологов. Затем часть отобранных хромосом измеряли в программе ImageJ. Мы измеряли каждое плечо хромосомы, проводя ломаную линию от центромеры до конца плеча, а также измеряли

длину участка занимаемого ЯОР. Затем вычисляли общую среднюю длину хромосомы, путем деления на два суммы длин всех плечей хромосомы, а также оценивали среднюю длину Ag-бэнда для каждой хромосомы. Используя полученную общую длину, рассчитывали относительную длину ЯОР на каждой хромосоме. Кроме того, вычисляли центромерный индекс каждой хромосомы, как отношение короткого плеча к общей длине хромосомы (Levan et al., 1964). Статистический анализ проводили с помощью стандартного статистического пакета Statistica 8. Мы сравнивали группы особей с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп.

Результаты

По результатам измерений было установлено, что относительная длина ЯОР у *P. lessonae* варьирует от 7 до 13% от длины хромосомы, а у *P. ridibundus* – от 6% до 13%. У диплоидных *P. esculentus* ЯОР имел длину 6–10%. Исключение составляла одна особь *P. esculentus*, у которой на одном из гомологов вообще не было ЯОР (0%), в то время как другая хромосома 9-й пары несла ярко-выраженный ЯОР нормального размера (рис. 2). Следует отметить, что все ядра клеток у этой особи также имели только один ЯОР. У триплоидных особей обеих форм мы наблюдали наибольший разброс в размерах ЯОР: от 5% до 14% (рис. 3). Сравнение родительских видов с использованием критерия Манна-Уитни не выявило значимых различий по данному признаку.

Центромерные индексы гомологов 9-й пары у *P. ridibundus* и у *P. lessonae* варьировали в одинаковых пределах (32–42%). У гибридов диапазон изменчивости данного признака оказался немного шире (28–40%). Значимых различий при сравнении хромосом родительских видов по этому признаку мы также не обнаружили.

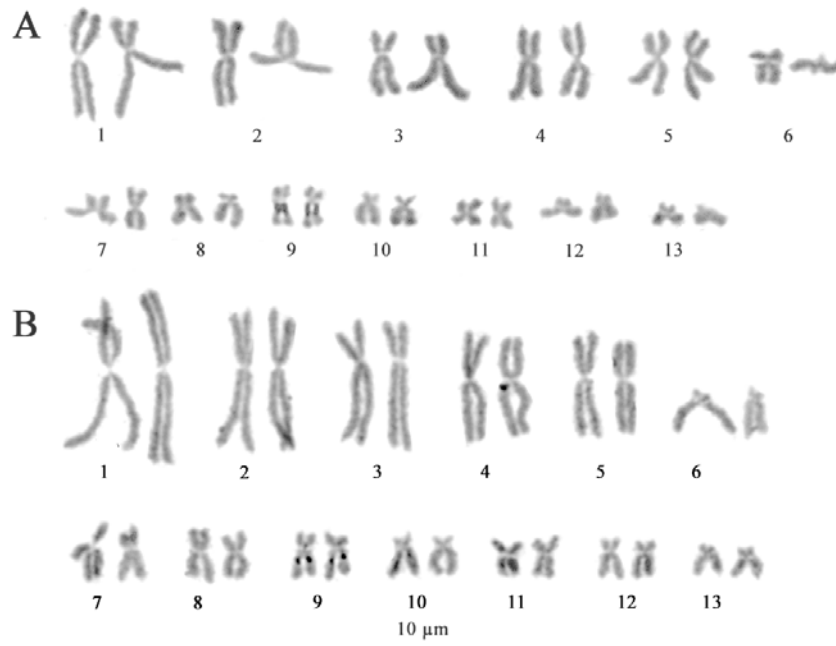


Рис. 1. Кариотипы родительских видов: А – *P. lessonae*, Республика Марий Эл, с. Большая Кокшага; В – *P. ridibundus*, Волгоградская область, с. Большой Еруслан

В соответствии с изначальной гипотезой, мы также проверили предположение, что асимметрия между двумя (тремя в случае триплоидов) ЯОРами в одной клетке у гибридов выше, чем у родительских видов. Для каждой пластинки мы рассчитали разницу относительных длин ЯОР, расположенных на двух гомологах (гомеологах). В случае триплоидов рассчитывали средний показатель асимметрии от попарных сравнений внутри каждой тройки ЯОР-несущих хромосом. Затем мы сравнили по этому признаку родительские виды с гибридами. Различия в асимметрии между двумя группами также оказались не значимыми.

На рис. 4 представлен ряды ЯОР-несущих хромосом всех изученных особей, расположенные в ячейках, соответствующих определенному локалитету и виду.

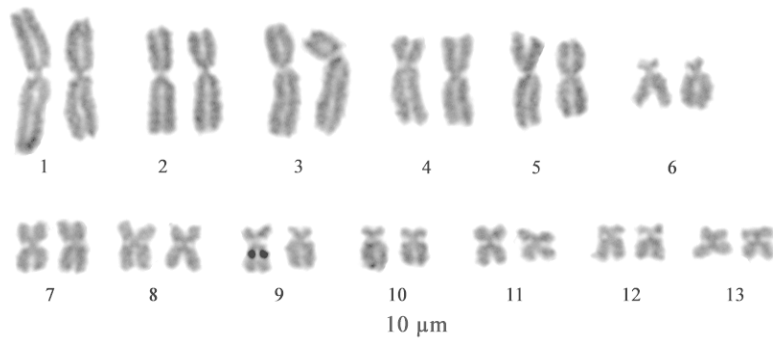


Рис. 2. Кариограмма диплоидной особи *P. esculentus*, Днепропетровская область, с. Николаевка. ЯОР несет только один из гомологов 9-й пары

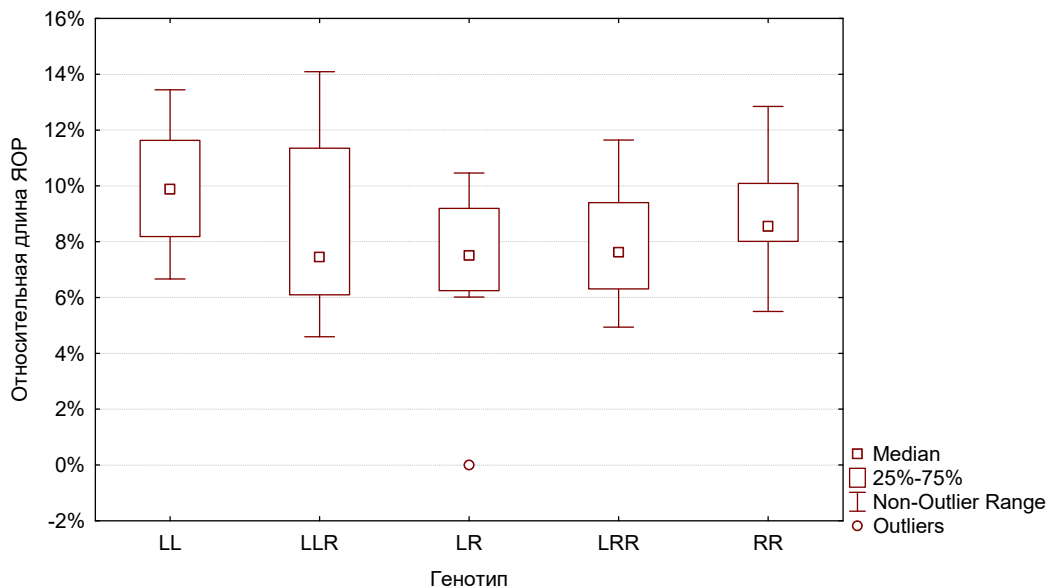


Рис. 3. Относительная длина ЯОР на хромосомах родительских видов и разных форм гибридов *Pelophylax esculentus* complex. Outliers – 9-я хромосома, не имеющая выраженного ЯОР (см. рис. 2)

Обсуждение

На рис. 4 можно заметить, что гибриды часто имеют гомеологи, заметно отличающиеся по форме и размерам ЯОР, как, например, особи из с. Дробышево, Иськова пруда, Гайдар и Сухой Гомольши. Однако среди изученных нами *P. ridibundus* также встречаются особи, у которых один ЯОР был заметно больше второго (Большой Еруслан и Гайдары), а у особи, отловленной в черте г. Харькова, на ул. Клочковская, одна из хромосом несла четко разделенный двойной ЯОР. Удвоенный ЯОР также был обнаружен у LRR триплоида из р. Чепель (Харьковская область). Интересно, что у этой особи в некоторых метафазах на той же хромосоме ЯОР выглядел как одиночный, но увеличенный в размерах, а в некоторых случаях вообще не отличался от обычного ЯОР (рис. 4). Удвоенные ЯОРы ранее были описаны у ряда амфибий, в том числе и у *P. ridibundus* (Schmid, 1982).

Локалитет	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Республика Марий Эл, Большая Кокшага			
Республика Марий Эл, Яльчик			
Волгоград, Большой Еруслан			
Харьков, р. Чепель			
Кировоград, Черный лес			
Донецк, Дробышево			
Турция, Финике			
Болгария, Голямо			
Хорватия, оз.Поникве			
Волынь, оз. Свитязь			
Новгород, оз.Соминец			
Херсон, Корсунка			
Молдавия, Мокра			
Днепропетровск, Николаевка			
Харьков, с. Гайдары			
Харьков, с. Гинеевка			


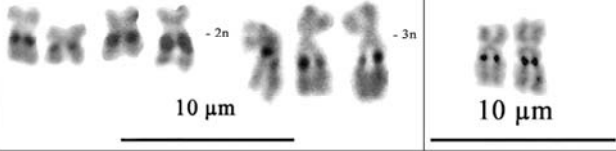
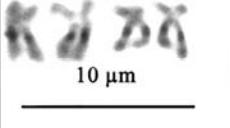

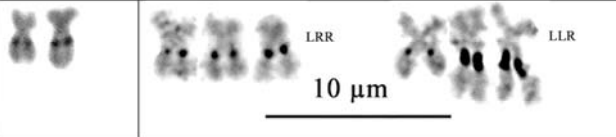
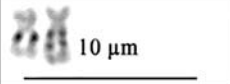

Локалитет	<i>P. lessonae</i>	<i>P. ridibundus</i>	<i>P. esculentus</i>
Харьков, г. Дергачи			
Харьков, Добрицкий пруд			
Харьков, Иськов пруд			
Харьков, Сухая Гомольша			
Харьков, пруд на ул. Клочковской			
Харьков, с. Эсхар			

Рис. 4. ЯОР-несущие хромосомы зеленых лягушек родительских видов (первая и вторая колонки) и гибридов зеленых лягушек *Pelophylax esculentus* complex. Каждая пара (тройка) хромосом соответствует одной особи

Примечания: * – две приведенные тройки хромосом принадлежат одной особи, однако на второй из них третья по счету хромосома несет удвоенный ЯОР, в то время как на первой все ЯОРы обычные; ** – хромосомы триплоидной особи, у которой одна из больших хромосом несет дополнительный ЯОР (см. рис. 6).

У троих из четырех триплоидов, для которых состав геномов был определен как LLR, две хромосомы несут заметно более длинные ЯОРы, чем третья (Донецк, Дробышево; Харьков, Сухая Гомольша), в то время как на хромосомах лягушек с генотипом LRR обычно одна хромосома несет ЯОР чуть более крупный, чем остальные две. Отсюда можно сделать вывод, что хромосомы с большим ЯОР соответствуют геномам *P. lessonae*. Однако такое предположение не подтвердилось измерениями ЯОРов на хромосомах родительских видов.

Как известно, серебром окрашиваются не только ЯОРы на метафазных хромосомах, но и ядрышки в интерфазных ядрах. По нашим наблюдениям, у диплоидных особей в ядрах может быть видно одно или два ярко окрашенных ядрышка, в то время как у триплоидов присутствуют ядра с одним, двумя и тремя ядрышками (рис. 5). Это явление, возможно, связано с тем, что в интерфазе не все ЯОР могут быть транскрипционно активны (Summer, 2003). Однако, просматривая достаточно большое количество Ag-окрашенных ядер соматических клеток, по максимальному числу ядрышек можно определить ploidy особи (рис. 5). Таким образом, серебрение можно использовать, как удобный метод для определения ploidy гибридов при отсутствии на препаратах качественных метафаз. Однако в некоторых исключительных случаях количество ядрышек может не совпадать с ploidy. Например, диплоидный гибрид из с. Николаевка (Днепропетровская область) во всех ядрах имел только по одному ядрышку из-за утери или инактивации ЯОР в одном из геномов (рис. 2). У другого триплоидного гибрида, напротив, мы обнаружили дополнительный ЯОР на одной из больших хромосом (рис. 6, А). Видимо, дополнительный ЯОР появился вследствие транслокации или неравного кроссинговера. Наличие дополнительного активного ЯОР привело к тому, что во многих ядрах были видны 4 ядрышка (рис. 6, В). Поэтому в тех случаях, когда не удается получить

качественные метафазы, определение плоидности по количеству ядрышек нужно использовать в сочетании, например, с измерением размера эритроцитов (Бондарева и др., 2012).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что размер ЯОР не может быть использован как надежный видоспецифичный хромосомный маркер. Однако метод серебрения может быть полезен для определения плоидности гибридов и позволяет регистрировать такие явления, как удвоение района ядрышкового организатора, утеря или появление дополнительного активного ЯОРа.

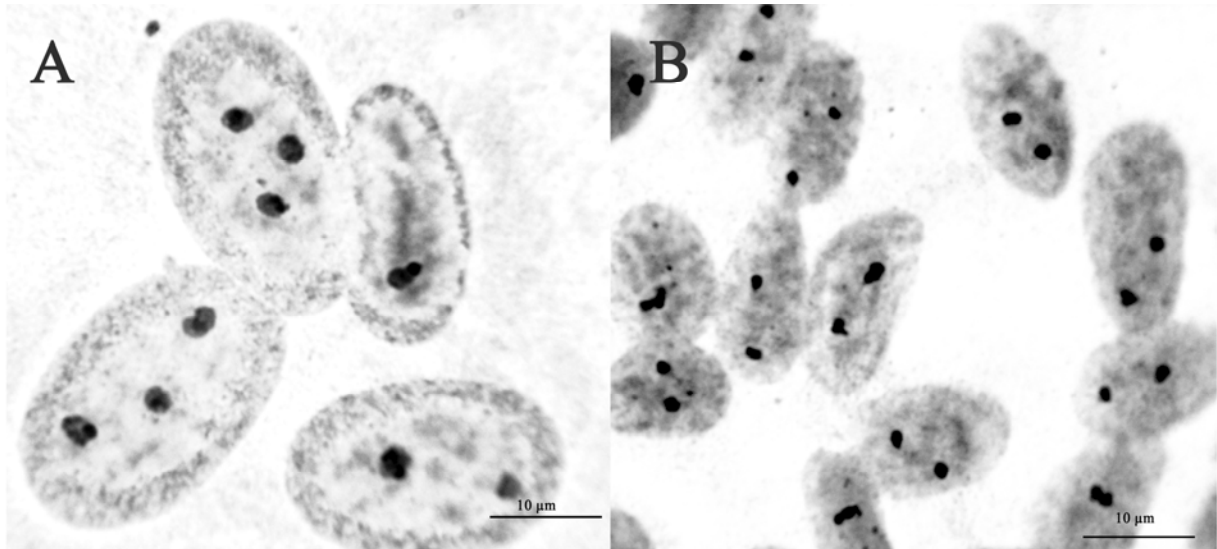


Рис. 5. Аг-окрашенные ядра соматических клеток зеленых лягушек. Ядрышки видны в виде интенсивно окрашенных областей: А – триплоидная особь *P. esculentus*; В – диплоидная особь *P. esculentus*

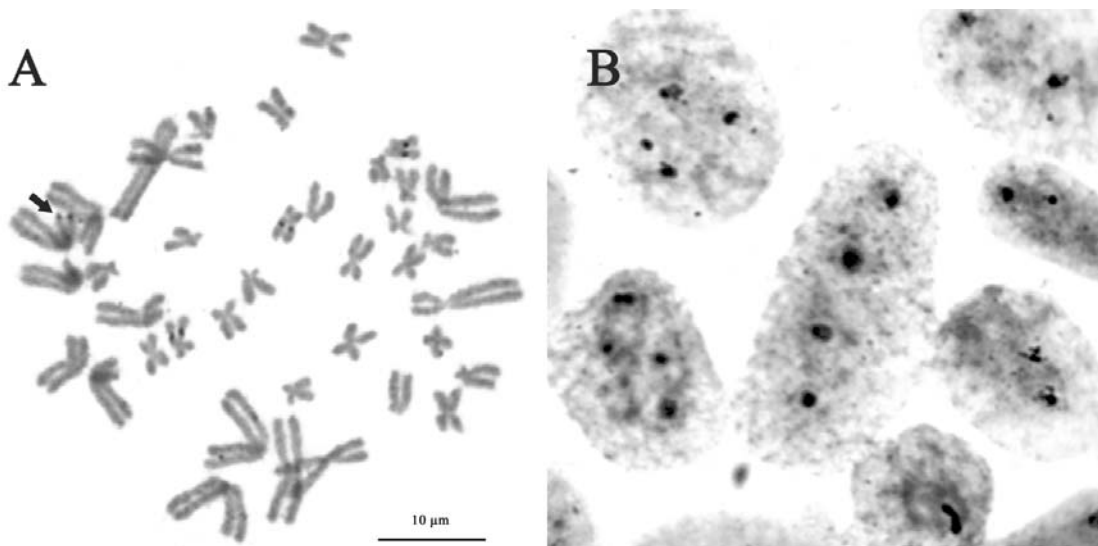


Рис. 6. Клетки триплоидной особи *P. esculentus* из окрестностей с. Гайдары. Аг-окрашивание: А – метафазная пластинка. Стрелка указывает на нетипичный дополнительный ЯОР на одной из больших хромосом. В – четыре ядрышка в интерфазе

Благодарности

Мы искренне признательны Г.Мазепе, К.Д.Мильто, А.О.Свинину, Д.В.Скоринову, О.В.Безман-Мосейко и А.В.Коршунову за сбор и предоставление нам для изучения зелёных лягушек, а также

Д.А.Шабанову за допомогу на всіх етапах роботи. Данне дослідження було частинно профінансовано грантами РФФИ 15-04-05068 и 15-29-02546.

Список літератури

- Бондарева А.А., Бибик Ю.С., Самило С.М., Шабанов Д.А. Цитогенетические особенности эритроцитов зеленых лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2012. – Вип.15 (№1008). – С. 116–123. /Bondareva A.A., Bibik Yu. S., Samilo S. M., Shabanov D. A. Tsitogeneticheskiye osobennosti eritrotsitov zelenykh lyagushek iz Seversko-Donetskogo tsentra raznobraziya *Pelophylax esculentus* complex // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2012. – Vyp.15 (№1008) – S. 116–123./ http://batrachos.com/Бондарева_2012_Цитогенетические
- Вегерина А.О., Мелешко Е.В., Пырина И.С. и др. Определение соотношения диплоидов и триплоидов среди метаморфов зеленых лягушек в Северско-Донецком центре разнообразия *Pelophylax esculentus* complex // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2013. – Вип.18 (№1079). – С. 107–113. /Vegerina A.O., Meleschko Ye.V., Pyrina I.S et al. Opredeleniye sootnoscheniya diploidov i triploidov sredi metamorphov zelenykh lyagushek v Seversko-Donetskom tsentre raznobraziya *Pelophylax esculentus* complex // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2013. – Vyp.18 (№1079). – S. 107–113./ http://batrachos.com/Вегерина_др_2014_Метаморфы/
- Кайбелева Э.И., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г. Эколого-кариологические особенности озерных лягушек севера Нижнего Поволжья // Поволжский экологический журнал. – 2004. – №3. – С. 318–319. /Kaybeleva E.I., Zav'yalov Ye.V., Tabachishin V.G. Ekologo-kariologicheskiye osobennosti ozernykh lyagushek severa Nizhnego Povolzh'ya // Povolzhskiy ekologicheskiy zhurnal. – 2004. – №3. – S.318–319./
- Манило В.В., Радченко В.И., Коршунов А.В. Исследование каріотипа съедобной лягушки (*Rana kl. esculenta*) из Харьковской области Украины // Науковий вісник Ужгородського університету. Сер. Біологія. – 2007. – Вип.21. – С. 68–73. /Manilo V.V., Radchenko V.I., Korschunov A.V. Issledovaniye kariotipa s'yedobnoy lyaguschki (*Rana kl. esculenta*) iz Kharkovskoy oblasti Ukrainy // Naukovy visnyk Uzhgorods'kogo universytetu. Ser. Biologia. – 2007. – Vyp.21. – S.68–73./
- Сурядная Н.Н. Материалы по каріологии зеленых лягушек (*Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, *Rana esculenta*) с территории Украины // Вестн. зоол. – 2003. – №37 (1). – С. 33–40. /Suryadnaya N.N. Materialy po kariologii zelenykh lyagushek (*Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, *Rana esculenta*) s territorii Ukrainy // Vestn. zool. – 2003. – №37 (1). – S. 33–40./
- Шабанов Д.А., Коршунов О.В., Кравченко М.О. Які ж зелені жаби населяють Харківську область? Термінологічний і номенклатурний аспекти проблеми // Біологія та валеологія. – Вип.11. – Харків: ХДПУ, 2009. – С. 116–125. /Shabanov D.A., Korshunov O.V., Kravchenko M.O. Yaki zh zeleni zhaby naselyayut' Kharkivs'ku oblast'? Terminologichnyy i nomenklaturnyy aspekty problemy // Biologiya ta valeologiya. – Kharkiv: KhDPU, 2009. – Vyp. 11. – S. 116–125./ http://batrachos.com/Шабанов_ін_2009_Які_зелені_жаби
- Berger L. Is *Rana esculenta lessonae* Camerano a distinct species? // Ann. Zool. PAN. – 1964. – Vol.22, №13. – P. 245–261.
- Birstein V.J. Localization of nors in karyotypes of four rana species // Genetica. – 1984. – Vol.64, No 3. – P. 149–154.
- Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J. et al. Optional endoreplication and selective elimination of parental genomes during oogenesis in diploid and triploid hybrid european water frogs // Plos One. – 2015. – Vol.10, No 4. – P. 1–19.
- Frost D.R., Grant T., Faivovich J. et al. The amphibian tree of life // B. Am. Mus. Nat. Hist. – 2006. – Vol.297. – 370 p.
- Günther R. Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pall. und das Vorkommen von Triploidie bei *Rana esculenta* L. (Anura, Amphibia) // Biol. Zentralblatt. – 1970. – №89 (3). – P. 327–342.
- Heppich S. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta* // Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. – 1978. – Vol. 16. – P. 27–39.
- Heppich S., Tunner H., Greilhuber J. Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta* // Theor. Appl. Genet. – 1982. – Vol.61. – P. 101–104.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. Nomenclature for centromeric position at chromosomes // Hereditas. – 1964. – P. 201–220.
- Marracci S., Raghianti M. The hybridogenetic *Rana (Pelophylax) esculenta* complex studied in a molecular context // Italian Journal of Zoology. – 2008. – Vol.75, No 2. – P. 109–112.
- Miura I. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera rana, *Rana*, *Hyla*, and *Bufo* (Amphibia: Anura) // Chromosoma. – 1995. – Vol.103, No 8. – P. 567–574.

- Plötner J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche. – Bielefeld: Laurenti-Verlag, 2005. – 161S.
- Plotner J., Klinkhardt M. Investigations on the genetic structure and the morphometry of a pure hybrid population of *Rana k. esculenta* (Anura, Ranidae) in North Germany // Zool. Anz. – 1992. – Vol.229, No 3/4. – P. 163–184.
- Ragghianti M., Bucci S., Marracci S. et al. Gametogenesis of intergroup hybrids of hemiclinal frogs // Genetical research. – 2007. – Vol.89, No 1. – P. 39–45.
- Schempp W., Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta* // Chromosoma. – 1981. – P. 697–710.
- Schmid M. Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae // Chromosoma. – 1978. – Vol.68. – P. 131–148.
- Schmid M. Chromosome banding in amphibia VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura // Chromosoma. – 1982. – Vol.87. – P. 327–344.
- Schmid M., Feichtinger W., Weimer R. et al. Chromosome banding in Amphibia. XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae) // Cytogenet. Genome Res. – 1995. – Vol.69. – P.1826.
- Summer A.T. Chromosomes – organization and function. – Blackwell, 2003. – 294s.
- Tunner H.G. Die Klonale Struktur einer Wasserfroschpopulation // Z. zool. Syst. und Evolut.-forsch. – 1974. – Bd.12, №4. – P. 309–314.
- Tunner H.G., Heppich-Tunner S. Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog // Naturwissenschaften. – 1991. – Vol.78. – P. 32–34.
- Vinogradov A.E., Borkin L.J., Günther R., Rosanol J.M. Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry // Genome. – 1990. – Vol.33. – P. 619–627.
- Wickbom T. Cytological studies on dipnoi, urodela, anura, and emys // Hereditas. – 1945. – Vol.31, No 3–4. – P. 241–346.
- Zaleśna A., Choleva L., Ogielska M. et al. Evidence for integrity of parental genomes in the diploid hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* by genomic in situ hybridization // Cytogenetic and Genome Research. – 2011. – Vol.134, No 3. – P. 206–212.

Представлено: Т.Ю.Маркіна / Presented by: T.Yu.Markina
Рецензент: Н.Є.Волкова / Reviewer: N.Ye.Volkova
Подано до редакції / Received: 01.10.2015