

УДК 579.6:576.316(477)

ИССЛЕДОВАНИЕ КАРИОТИПА СЪЕДОБНОЙ ЛЯГУШКИ (*RANA KL ESCULENTA*) ИЗ ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ УКРАИНЫ

В. В. Манило, В И Радченко, А. В. Коршунов

*Сравнительно-кариологический анализ съедобной лягушки (*Rana kl esculenta* Linnaeus, 1758) из Харьковской области Украины. — В. В. Манило¹, В И Радченко², А. В. Коршунов³. — Проанализированы карิโอциты 21 экземпляра *Rana kl esculenta* из Харьковской области Украины. На препаратах крови 2-х экземпляров (1 самец из окр. г. Балаклея и 1 самка из окр. с. Гайдары (Иськов пруд)) метафазные пластинки имели триплоидный набор хромосом — $3n=18v+15sv+6sT=39$, $NF=78$. Все другие особи имели нормальный набор хромосом — $2n=12v+10sv+4sT=26$, $NF=52$. На препаратах семенников 5 экземпляров обнаружено явление миксополиидии: в гонадах ($n=13$; $2n=26$; $3n=39$; $4n=52$ и т. д), а в клетках сперматогонияльного деления ($2n=26$; $4n=52$; $6n=78$). Вторичная перетяжка расположена на длинном плече 9-ой пары хромосом. Половые хромосомы не идентифицированы.*

Ключевые слова: *Rana kl esculenta*, карิโอцит, триплоид, миксополидия.

Адреса: ¹ Национальный Научно-природоведческий Музей НАН Украины, ул. Богдана Хмельницкого, 15, Киев, 01030, Украина, e-mail: valentina_manilo@mail.ru. ² Национальный Научно-природоведческий Музей НАН Украины, ул. Богдана Хмельницкого, 15, Киев, 01030, Украина, e-mail: victor_radchenko@museumkiev.org. ³ Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: alexey_korshunov@list.ru

*Порівняльно-кариологічний аналіз їстівної жаби (*Rana kl esculenta* Linnaeus, 1758) із Харківської області України. — В. В. Манило, В. І. Радченко², О. В. Коршунов³. — Проаналізовано каріотипи 21 особини *Rana kl esculenta* із Харківської області України. На препаратах крові 2-х особин (1 самець з окол. м. Балаклєї та 1 самка з окол. с. Гайдары (Иськов ставок) метафазні пластинки мали триплоїдний набір хромосом — $3n=18v+15sv+6sT=39$, $NF=78$. У всіх інших каріотип мав нормальний набір хромосом — $2n=6v+16sv+4sT=26$, $NF=52$. На препаратах сім'яників у 5 особин було виявлено явище міксополіїдії: в гонадах ($n=13$; $2n=26$; $3n=39$; $4n=52$ и т. д), а в клітинах сперматогоніального поділу — ($2n=26$; $4n=52$; $6n=78$). Вторинна перетяжка розташована на довгому плечі 9-ї пари хромосом. Статеві хромосоми не ідентифіковані*

Ключові слова: *Rana kl esculenta*, каріотип, триплоїд, міксополіїдія.

Адреси: ¹ Національний Науково-природознавчий Музей НАН України, вул. Богдана Хмельницького, 15, Київ, 01030, Україна, e-mail: valentina_manilo@mail.ru. ² Національний Науково-природознавчий Музей НАН України, вул. Богдана Хмельницького, 15, Київ, 01030, Україна, e-mail: victor_radchenko@museumkiev.org. ³ Харківський національний університет ім. В. М. Каразина, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна, e-mail: alexey_korshunov@list.ru

*Comparative karyological analysis of edible frog (*Rana kl esculenta* Linnaeus, 1758) from the Kharkov region of Ukraine. — V. V. Manilo¹, V. I. Radchenko², A. V. Korshunov³. — The karyotypes of 21 specimens of *Rana kl esculenta* from the Kharkov region of Ukraine are analysed. On blood's preparations 2 specimens (1 male from t. Balakleja and 1 female from w. Gaydary (Iskov pond)) had triploidy number of chromosomes — $3n=18v+15sv+6sT=39$, $NF=78$. All other specimens had normal karyotype — $2n=12v+10sv+4sT=26$, $NF=52$. The phenomenon mixed polyploidization (mixoploidy) on testicle preparations of 5 specimens were are revealed: in gonads ($n = 13$; $2n = 26$; $3n = 39$; $4n = 52$ at all) and in the cells of spermatogonial divisions ($2n=26$; $4n=52$; $6n=78$). Secondary transcripction it is located on a long shoulder of 9-th pair of chromosomes. Sexual chromosomes are not identified.*

Key words: *Rana kl esculenta*, karyotype, triploid, mixoploidy.

Address: ¹ Zoomuseum NMNH NAS of Ukraine, Bogdan Khmelniyskiy street, 15, Kiev, 01030, Ukraine, e-mail: valentina_manilo@mail.ru. ² Zoomuseum NMNH NAS of Ukraine, Bogdan Khmelniyskiy street, 15, Kiev, 01030, Ukraine, e-mail: victor_radchenko@museumkiev.org. ³ Department of Zoology and Animal Ecology, Kharkov National University, Kharkov, Svobody sq. 4, 61077, Ukraine, e-mail: alexey_korshunov@list.ru

Введение

Необычный способ видообразования в комплексе зеленых лягушек (*Rana (Pelophilax) esculenta* комплекс) характеризуется сложными генетическими

механизмами. Изучение таких механизмов разными методами дает более полную картину их появления и протекания [1,4,10,16,17,18,25]. На тер-

ритории Украины комплекс зеленых лягушек представлен двумя родительскими видами *Rana ridibunda* Pallas, 1771 и *Rana lessonae* Camerano, 1882, и их гибридом *Rana kl. esculenta* Linnaeus, 1758 [3,11,15], изучению которых посвящено большое количество работ как отечественных так и зарубежных авторов.

В результате изучения кариотипов зеленых лягушек из некоторых областей Украины [12,13] описана морфология хромосом (плечевые и центромерные индексы, относительная и абсолютная длина кариотипов, частота хиазм). На препаратах семенников у *Rana kl. esculenta* из Харьковской области, были найдены клетки с полиплоидными (смешанная полиплоидизация) и анеуплоидными наборами хромосом. Аналогичная ситуация отмечена при изучении кариотипов зеленых и бурых лягушек Житомирской области Украины, где так же были найдены клетки с три-, тетра- и гексаплоидными наборами [8,9]. По внешней морфологии хромосом полиплоидные наборы не отличались от нормальных кариотипов [8].

В то же время, при определении размера генома *Rana kl. esculenta* методом проточной ДНК цитофотометрии в Восточной Украине (Луганская, Донецкая, Харьковская области) были найдены популяции зеленых лягушек, в которых, наряду с диплоидными особями, обнаружено около 36% триплоидов [21]. В результате изучения кариотипов из этих областей триплоидных особей в данных популяциях не было выявлено [14].

Расхождение в данных кариологии и ДНК-цитометрии вызвало необходимость цитогенетической ревизии *R. kl. esculenta* востока Украины.

Материал и методика

Хромосомные препараты были приготовлены по общепринятой методике [5] из клеток крови и семенников предварительно колхицинированных животных и введением им 0,02% раствора фитогемаагглютинина (ФГА, НПК «Лектинотест», г. Львов), для усиления митотической активности клеток [6,7]. Препараты окрашивали красителем Гимза, форму хромосом определяли по классификации, предложенной Леваном с соавт. [23]. Абсолютную длину, плечевой (AR) и центромерный (Ci) индексы определяли после измерения длин длинного и короткого плеч каждой хромосомы. Исследования проводили на микроскопе "БиоламМ-Л-212" при увеличении 900. Для фотографий отбирались пластинки с четкой морфологией хромосом и с минимальным количеством накладок. Статистическая обработка материалов проводилась на персональном компьютере при использовании пакета программы Microsoft «Excel».

Объем исследованного материала приведен в таблице 1

Результаты

Анализ препаратов крови и костного мозга *Rana kl. esculenta*, показал, что из 21 исследованного экземпляра 14 имели нормальный кариотип: 5 крупных и 8 мелких пар хромосом, вторичная перетяжка локализована на длинном плече 9 пары хромосом, на отдельных пластинках – на коротком плече третьей пары хромосом. Хромосомная формула $2n=12v+10sv+4sT$, $NF=52$ (Рис.1).

Табл. 1 Объем и характеристика исследованного материала

Место находки	Пол / возраст	№ предметного сте-кла	Количество хромосом в гаметах, на стадиях диакинеза и метафазы	Количество хромосом в крови и костном мозге
			II мейоза	
Харьковская область Змеевский район, с. Гайдары, Биостанция ХНУ (пойма р. Северский Донец)	M/ad	639	n=13, 2n=26	3n=39
		640	n=13, 2n=26	3n=39
		642	2n=13	–
		641	–	2n=26
		643	–	2n=26
		644	–	2n=26
Харьковская область Г. Балаклея, пойма р. Балаклея	M/ad	645	–	–
		650	–	2n=26
		655	–	2n=26
		656	2n=26	3n=39
		657	2n=13	2n=26
		658	2n=13, 2n=26, 4n=52	2n=26
		679	2n=13, 2n=26, 4n=52	2n=26
		680	2n=13, 2n=26	–
		654	–	2n=26
		659	–	2n=26
Харьковская область Змеевский район, с. Гайдары, Биостанция ХНУ (Иськов пруд)	F/ad	684	–	3n=39
	M/ad	681	2n=13, 2n=26, 4n=52	2n=26
		682	2n=13	2n=26
		683	2n=13	2n=26
		685	2n=13, 2n=26	2n=26

Табл. 2. Величина плечевого индекса и типы хромосом *Rana kl esculenta* (по разным авторам).

№ пары хромосом	Плечевой индекс (AR) и тип хромосом (type)									
	Сурядная, 2003		Meszaros, Bartos, 1978		Koref-Santibañez, 1970		Gunter, 1970		Наши данные	
	AR	type	AR	type	AR	type	AR	type	AR	type
1	1,2	m	1,27	m	1,24	m	1,21	m	1,3	m
2	1,5	m	1,2	Sm	1,46	Sm	1,66	m	1,62	m
3	1,9	Sm	1,53	m	2,13	m	2,17	Sm	2,25	Sm
4	1,5	Sm	2,01	Sm	1,41	m	1,32	m	1,35	m
5	1,4	m	1,34	m	1,25	m	1,26	m	1,5	m
6	1,2	m	0,3	m	1,11	m	1,26	m	1,25	m
7	1,4	m	0,29	St	1,14	m	1,35	m	1,75	Sm
8	2,6	St	4,98	Sm	2,73	Sm	3,54	St	4,5	St
9	2,2	Sm	3,94	St	2,35	Sm	2,67	St	2,7	St
10	3,4	Sm	2,86	Sm	2,01	Sm	1,95	Sm	1,72	Sm
11	1,2	m	1,38	m	1,15	m	1,31	m	1,2	m
12	1,7	m-Sm	3,63	Sm	1,62	m-Sm	1,92	Sm	1,8	Sm
13	2,1	Sm	2,27	Sm	2,00	m	1,79	Sm	1,7	Sm



Рис. 1. Кариограмма *Rana kl esculenta*
 Нормальный кариотип, препарат крови – $2n=12v+10sv+4sT$, $NF=52$ ($2n=26$). Харьковская область.

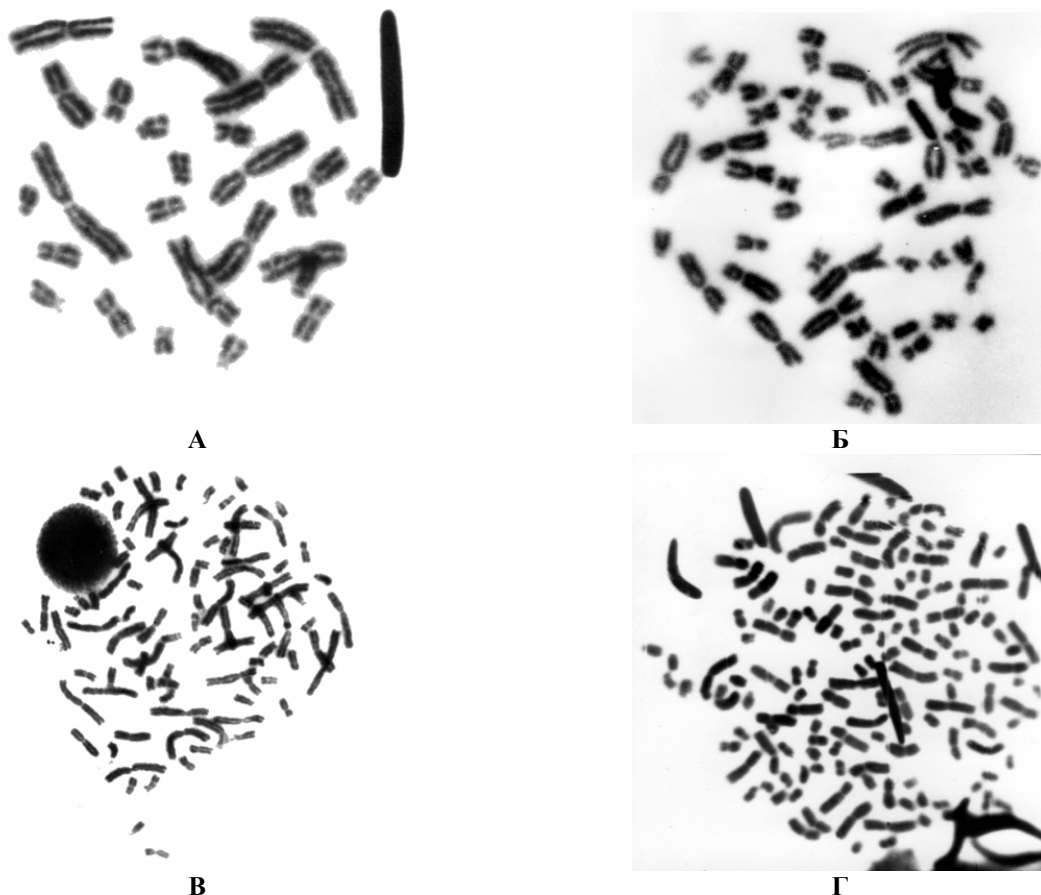


Рис.2. Митотические хромосомы *Rana kl esculenta* (препараты семенников)
 а. Метафазная пластинка с диплоидным набором хромосом ($2n=26$).
 б. Метафазная пластинка с тетраплоидным набором хромосом ($4n=52$).
 в. Метафазная пластинка с гексаплоидным набором хромосом ($6n=78$).
 г. Метафазная пластинка с декаплоидным набором хромосом ($10n\approx 130$).

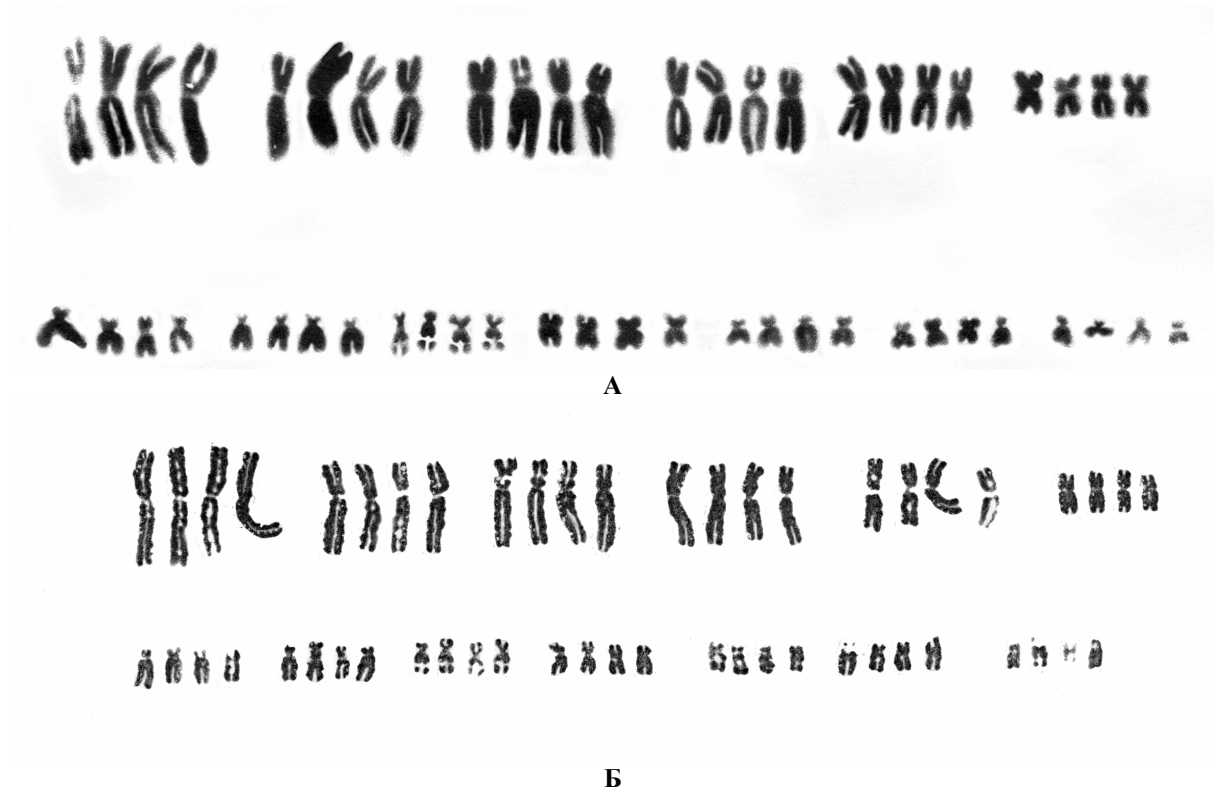


Рис. 3. Кариогаммы *Rana kl esculenta*
 а. Тетраплоидный кариотип, препарат семенника – $4n=24v+20sv+8sT$, $NF=104$ ($4n=52$). Харьковская область.
 б. Тетраплоидный кариотип, препарат семенника. – $4n=24v+20sv+8sT$, $NF=104$ ($4n=52$). Житомирская область



Рис 4. Тетраплоидная гамета (Метафаза I мейоза ($4n=52$)). Харьковская область.

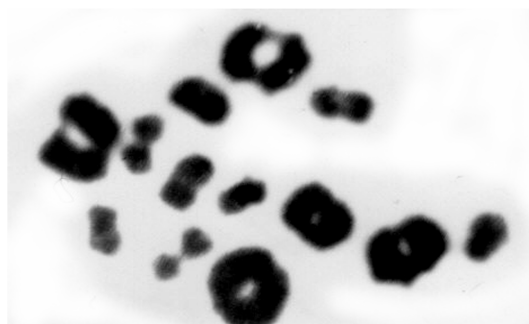
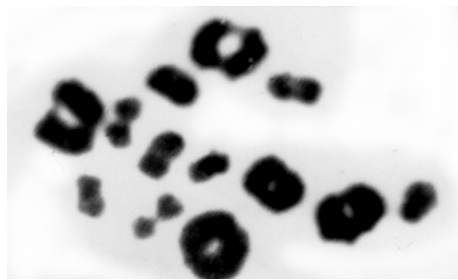
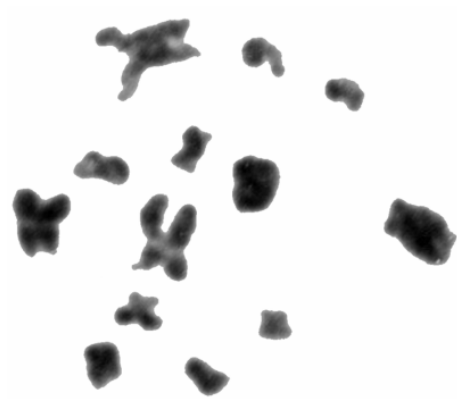


Рис. 5. Кариогамма *Rana kl esculenta*.
 Триплоидный кариотип ($3n=39$), препарат крови – $3n=18v+15sv+6sT$, $NF=76$. Харьковская область



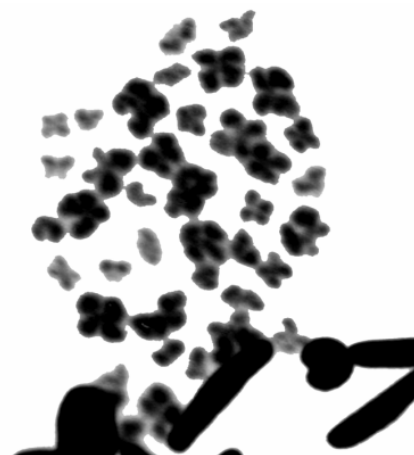
А



Б



В



Г

Рис. 6. Мейотические хромосомы триплоидных экземпляров *Rana kl esculenta*
 а. Метафаза I мейоза ($n=13$), (гаплоидная гамета).
 б. Метафаза II мейоза ($n=13$), (гаплоидная гамета).
 в. Метафаза I мейоза ($2n=26$), (диплоидная гамета)
 г. Метафаза II мейоза ($2n=26$), (диплоидная гамета)

На препаратах семенников 5 экземпляров было обнаружено явление миксоплоидии, аналогичное описанному в Житомирской области Украины у зеленых и бурых лягушек [8,9]. Метафазные пластинки сперматогониального деления включали 52, 78, 130, хромосом, рис 2 а-г); Рис 3 (а,б) . Подобная ситуация наблюдалась и в гонадах, где рядом с нормальным количеством хромосом было обнаружено его кратное увеличение (Рис 4).

2 экз. *R. kl esculenta* (1 самец из поймы р. Балаклея и 1 самка из Иськова пруда) имели триплоидный набор хромосом. Хромосомная формула соответственно имела вид – $3n=18v+15sv+6sT=39$, $NF=78$ (Рис. 5), вторичная перетяжка локализована на длинном плече 9 триады хромосом. На препаратах семенников присутствовали гаметы только с 13 и 26 бивалентами метафазы I мейоза и 13 и 26 хромосомами метафазы II мейоза. Рис.6

За отсутствием достаточного количества метафазных пластинок наявность еще двух триплоидов вызывает сомнение Табл. 1 (№ препарата 639–640).

Обсуждение

По количеству хромосом в диплоидных наборах ($2n$) *R. kl esculenta* наше описание не отличается от описаний других авторов как с территории Украины так и с сопредельных территорий [12,13,14,18,19,20,25].

Наличие гетероморфной (12 пары), описанной некоторыми авторами [12,14,19], нашими исследованиями не подтвердилось, что может свидетельствовать о локальности проявления данного признака.

Отличия в описании кариотипов в основном касаются морфологи мелких пар хромосом, что может объясняться разной степенью спирализации. Данное предположение вероятно справедливо и в отношении вторичных перетяжек, которые по данным разных авторов расположены на 9-й [12,14]; 10-ой [18,19]; 11– [2] паре хромосом. Согласно нашему исследованию, вторичная перетяжка локализована на длинном плече 9-ой пары хромосом у большинства экземпляров.

Таким образом, анализируя наши данные и других авторов, можно сделать вывод, что по морфологии хромосом наши данные наиболее близки к данным Гюнтера [18] Таб. 2, а по вторичным перетяжкам с Сурядной [12,14].

Массовое распространение триплоидов по территории материковой Европы среди *Rana esculenta* complex в основном приурочено к ее северной части (север Франции, Нидерланды, Дания, Германия, Польша,) [17,20,24], хотя эпизодическое нахождение триплоидов наблюдается и на других территориях [20,21] вероятно к таковым относится и Восточная Украина.

По морфологии хромосом триплоидные экземпляры с территории Украины идентичны диплоидным. Вторичные перетяжки расположены на длинном плече 9 триады хромосом, так-же как и в нормальном кариотипе.

Мутации, выраженные в форме миксоплоидии в хромосомных наборах *R. kl esculenta* Харьковской области могут быть свидетельством как неблагоприятного экологического состояния мест их обитания так и в следствии неустойчивости или нарушений механизмов наследования внутри гибридогенного комплекса.

1. Боркин Л. Я., Виноградов А. Е., Розанов Ю. М., Цауне И. А. Полулокальное наследование в гибридогенном комплексе *Rana esculenta*: доказательство методом проточной ДНК-цитометрии // Докл. АН СССР. – М. – 1987. Т. 295, №5. С. -1261-1264.
2. Иванов В. Г., Мадянов Н. Н. Сравнительная кариология лягушек рода *Rana* // Цитология, – 1973. – 15, №7. – С.920-927.
3. Кузьмин С. Л. Земноводные бывшего СССР. – М.: Товарищество научных исследований КМК, 1999. – 298 С.
4. Лада Г. А. Средне европейские зеленые лягушки (Гибридный комплекс *Rana esculenta*) введение в проблему // Флора и фауна Черноземья. – Тамбов, – 1995. – С. 88-109
5. Макгрегор. Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами. – М.: Мир, 1986. –262 С.
6. Манило В. В. Кариотипы гекконов родов *Alsophylax* и *Grossobamon* // Вестн. Зоологии, – 1986. – №5. – С. 46-54.
7. Манило В. В. Кариологические исследования рептилий // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. – Киев, 1989. – С. 100-109.
8. Манило В. В. Миксоплоидия у *Rana ridibunda* и *Rana esculenta* (Anura, amphibia) из Житомирской области Украины // Мат. першої конф. Укр. Герпетол. т-ва / Ред. Є. Писанець. – К.: Зоомузей ННПМ НАН України, – 2005. – С. 99-104
9. Манило В. В. Хромосомные нарушения (миксоплоидия) у бурых лягушек (Anura, Amphibia) из некоторых областей Украины // збірник праць Зоологічного музею, – 2005. – №37. – С.100-108.
10. Межжерин С. В., Морозов-Леонов С. Ю. Популяционно-генетический анализ структуры гибридных популяций зеленых лягушек *Rana esculenta* L complex (amphibia, ranidae). // Цитология и генетика, – 1993. –27, №2. – С.63-67.
11. Писанец Е. М. Фауна амфибий Украины: вопросы разнообразия и таксономии Сообщение 2. Безхвостые амфибии (Anura) // Збірник праць зоологічного музею, – 2006. –№38. – С.44-79.
12. Сурядная Н. Н. Материалы по кариологии зеленых лягушек (*Rana ridibunda* Pallas, 1771; *Rana lessonae* Camerano, 1882; *Rana esculenta* Linnaeus, 1758 с территории Украины // Вестник зоологи, – 2003. – Т. 37, №1. – С. 33-40.
13. Сурядна Н. М. Мейотичні хромосоми *Rana esculenta* complex з території України // Цитология и генетика, – 2004. – № 6. – С. 28-32.
14. Сурядна Н. М. Зелені жаби фауни України: морфологічна мінливість, кариологія та особливості біології. – автореферат канд. Дис. – Киев, 2005.
15. Тарашук В. І. Фауна України. Земноводні та плазуни. – К.: видавництво академії наук Української РСР, 1959.– 245 С.
16. Berger L. Hibernation of the European water frog (*Rana esculenta* complex) // Zoologica poloninae, – 1982. V–29. – P 57-72.
17. Berger L. Is *Rana esculenta lessonae* camerano a distinct species? // Ann. Zool. PAN., –1964. V. 22. № 13. – P 245-261.
18. 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.
19. Korf-Santibanes S. The karyotypes of *Rana lessonae* Camerano, *Rana ridibunda*, *Rana esculenta* // Mitt. Zool. Berlin, – 1979. – 55, № 1 – P 115-124.
20. Meszaros B., Bartos L. A *Rana esculenta*-formakkor három magyarorszag alakjanak kariologiai feldolgazasa // Acta biol. Debres, – 1978. –15. – P. 239-256.
21. Leo J. Borkin, Alexey V. Korshunov, Georgiy A. Lada, Spartak N. Litvinchuk, Jury M. Rosanov, Dmitry A. Shabanov, and Alexander I. Zinenko. Mass occurrence of polyploidy green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine. // Russian Journal of Herpetology, – 2004. – Vol. 11, No 3. – P. 194–213.
22. Leo J. Borkin, Georgiy A. Lada, Spartak N. Litvinchuk, Daniel A. Melnikov, and Jury M. Rosanov. The first record of mass triploidy in hybridogenetic green frog *Rana esculenta* in Russia (Rostov obkast') // Russian Journal of Herpetology, – 2006. – 13 (1): – P 77-82.
23. Lewan A., Fredga K., Sandberg A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas, – 1984. –52. – P. 201-220.
24. Maria Ogielska, Piotr Kierzkowski, and Mariusz Rybacki. DNA content and genome composition of diploid and triploid water frogs belonging to the *Rana esculenta* complex (Amphibia, Anura). // Can. J. Zool., 2004. – 82(12): – P. 1894–1901. Ullerich F-H. Weitere Untersuchungen über Chromosomenverhältnisse und DNS-Gehalt bei Anuren (Amphibia) // Chromosoma, – 1967. – V-21, – 4. – P. 345-368.

Отримано: 12 січня 2007 р.

Прийнято до друку: 12 березня 2007 р.