



УДК 597.8:576.316(477)

**В.В. Манило, О.Н. Мануилова**

Национальный научно-природоведческий музей НАН Украины  
ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев, 01030 Украина

E-mail: valentina\_manilo@mail.ru olga\_manuilova@yahoo.com

## **СРАВНИТЕЛЬНО-КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУХ ВИДОВ ЧЕСНОЧНИЦ *PELOBATES FUSCUS* И *P. VESPERTINUS* (PELOBATIDAE, ANURA, AMPHIBIA) С ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ**

Описаны кариотипы и составлены хромосомные формулы двух видов чесночниц: *Pelobates fuscus* —  $2n = 16M + 10sM = 26$ ,  $NF = 52$  и *Pelobates vespertinus* —  $2n = 12M + 12sM + 2sT = 26$ ,  $NF = 52$ . Вторичные перетяжки расположены на коротком плече 7 пары хромосом. Кариотип обыкновенной чесночницы с территории Полтавской области отличается по морфологии некоторых пар хромосом от кариотипа как данного вида из других исследованных областей, так и чесночницы Палласа, однако имеет элементы сходства по количеству субметацентриков с обыкновенной чесночницей и наличие субтелоцентрической пары с чесночницей Палласа:  $2n = 14M + 10sM + 2sT = 26$ ,  $NF = 52$ . Это дает основание предположить, что по территории Полтавской области проходит зона интерградации данных видов.

Ключевые слова: *Pelobates fuscus*, *Pelobates vespertinus*, кариотип, хромосома, метафазная пластинка, плечевой индекс, таксономия, ареал, Украина.

### **Введение**

До недавнего времени для территории Украины приводили единственный вид семейства Pelobatidae Bonapartae, 1850 и рода *Pelobates* Wagner, 1830 — чесночница обыкновенная, *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768) (Таращук, 1959; Банников и др., 1977; Кузьмин, 1999; Писанец, 2007). Исследование в 2001 году генома чесночницы с Восточной Европы показало его неоднородность (Borkin et al., 2001), в результате чего авторы предложили разделить вид на 2 формы: «восточную» — *Pelobates fuscus vespertinus* и «западную» — *P. f. fuscus*. В течение последних 10 лет было проведено еще ряд исследований и высказано несколько доводов как за видовую самостоятельность этих форм так и против (Borkin et al., 2003; Crochet, Dubois, 2004; Crottini et al., 2007; Литвинчук и др., 2008; Kwet, Nollert, 2009). Недавнее достаточно обстоятельное исследование *Pelobates fuscus* с территории Восточной Палеарктики (Litvinchuk et al., 2013) подтвердило их видовую самостоятельность. В Украи-

не вид *Pelobates vespertinus* (Pallas 1771) отмечается в восточных областях, *P. fuscus* (Laurenti, 1768) — на всей остальной территории.

Предварительные результаты кариологического исследования, «западной» и «восточной» форм чесночниц с территории Украины были опубликованы нами ранее (Манило, Радченко, 2004, 2008). Сравнительный анализ полученных данных не показал существенных различий между кариотипами обеих форм. В силу небольшого объема исследуемого материала по «восточной» форме, а также изменения таксономического статуса данной группы, возникла необходимость повторного исследования обоих видов чесночниц с территории Украины в том числе и с ранее не исследованных мест обитания.

## Материал и методы

Материалом для исследования послужили сборы *Pelobates fuscus* из окр. городов Чернигова (6 самцов и 1 juv.) и Киева (3 самца и 1 самка), собранных в 2004 г.; окр. с. Васильевка Полтавского р-на, Полтавской обл. (4 самца и 1 самка), собранных в 2005 г., и *Pelobates vespertinus* из окр. с. Гайдары, Змиевского р-на, Харьковской обл. (4 самца и 1 самка); окр. с. Высокое, Михайловского р-на (1 самка) и с. Подгорное, Васильевского р-на (1 самец), Запорожской обл., собранных в 2013 г.

Кариопрепараты были приготовлены по общепринятым методикам из клеток крови, костного мозга и семенников предварительно колхицинированных животных. Для усиления митотической активности клеток крови за 6–7 дней до приготовления препаратов им вводили раствор фитогемагглютинина (ФГА) производства НПК «Лектинотест» г. Львова из расчета 0,02 мг. на 1 г веса животного (Макгрегор, Варли, 1986; Манило, 1989, Радченко, Манило 2009). После окрашивания красителем Гимза, препараты исследовались с помощью микроскопа Primo Star, Zeiss при увеличении 900 (об. 90, ок. 10). После вычисления плечевого индекса (отношение размера более длинного плеча к размеру более короткого) была определена форма каждой хромосомы согласно классификации, предложенной Леваном с соавторами (Lewan et al. 1964) по положению центромеры (табл. 1).

Было исследовано не менее 25 метафазных пластин каждого вида из каждого места отлова животных. Для кариотипирования и статистической обработки отобрано по 5 метафазных пластин с наилучшим разбросом хромосом и наименьшей их спирализацией.

Статистическая обработка данных производилась на персональном компьютере с помощью пакета Microsoft Excel и Statistica.

## Результаты

Кариотип *P. vespertinus*. Диплоидный набор из всех исследованных выборок Харьковской и Запорожской областей имеет одинаковое количество двуплечих хромосом ( $2n = 26$ ), которые четко делятся на 2 размерные группы: 7 пар крупных и 6 — мелких. Основное число также одинаковое для всех выборок —  $NF = 52$ , но кариотип существенно отличается от кариотипа предыдущего вида по морфологическим характеристикам 3, 5 и 9 пар хромосом:  $2n = 12M + 12sM + 2sT$  (1–2, 8 и 11 — 13 пары имеют метацентрический тип строения хромосом; 3–4, 6–7 и 9–10 пары — субметацентрический, а 5 пара — субтелоцентрический (табл. 1, рис.1). На большинстве исследованных метафазных пластин вторичная перетяжка была локализована на коротком плече 7 пары крупных хромосом (рис.1 б).

Кариотип *P. fuscus*. Диплоидный набор особей из всех исследованных выборок Киевской, Черниговской и Полтавской областей включает одинаковое количество двуплечих хромосом ( $2n = 26$ ) и четко делится на 2 размерные группы: 7 пар крупных и 6 — мелких, а также одинаковое основное число ( $NF = 52$ ). После опре-

Таблица 1. Плечевые индексы (AR) и морфология хромосом *P. fuscus* и *P. vespertinus*.Table 1. Arm ratio and morphology of chromosomes *P. fuscus* и *P. vespertinus*.

№ пары хромосом	<i>P. fuscus</i>				<i>P. vespertinus</i>	
	Выборки из Киевской, Черниговской обл.	Тип	Выборки из Полтавской обл.	Тип	Выборки из Запорожской, Харьковской обл.	Тип
1	1,60 ± 0,08	M*	1,44 ± 0,02	M	1,53 ± 0,06	M
2	1,44 ± 0,05	M	1,72 ± 0,03	sM	1,63 ± 0,04	M
3	1,57 ± 0,05	M	1,70 ± 0,07	M	1,73 ± 0,07	sM
4	1,88 ± 0,17	sM	1,61 ± 0,04	M	1,89 ± 0,06	sM
5	2,58 ± 0,25	sM	3,66 ± 0,18	sT	3,06 ± 0,15	sT
6	2,41 ± 0,11	sM	2,99 ± 0,16	sM	2,49 ± 0,16	sM
7	1,83 ± 0,09	sM	2,55 ± 0,11	sM	2,55 ± 0,16	sM
8	1,58 ± 0,06	M	1,66 ± 0,04	M	1,52 ± 0,07	M
9	1,45 ± 0,13	M	2,70 ± 0,09	sM	2,56 ± 0,07	sM
10	1,75 ± 0,10	sM	2,09 ± 0,10	sM	2,45 ± 0,04	sM
11	1,46 ± 0,20	M	1,63 ± 0,03	M	1,59 ± 0,02	M
12	1,28 ± 0,07	M	1,44 ± 0,03	M	1,38 ± 0,03	M
13	1,05 ± 0,05	M	1,59 ± 0,05	M	1,59 ± 0,04	M

Примечание. \* — Форма хромосом определена по величине плечевого индекса по классификации хромосом Леван с соавторами (Levan et. all, 1964): 1–1,7 — метацентрическая — M; 1,701–3,0 — субметацентрическая — sM; 3,01–7,0 — субтелоцентрическая — sT.

деления формы хромосом и проведения сравнительно-кариологического анализа было установлено, что животные из Киевской и Черниговской выборок имеют сходную по морфологическим параметрам хромосомную формулу:  $2n = 16M + 10sM$ : 1–3, 8–9 и 11–13 пары имеют метацентрический тип строения хромосом, а 4–7 и 10 — субметацентрический (табл.1, рис. 3).

Кариотип у животных из Полтавской обл. несколько отличается от предыдущего в первую очередь наличием 5-й субтелоцентрической пары и уменьшением на одну пару метацентриков:  $2n = 14M + 10sM + 2sT$  (табл.1, рис. 2). Вторичная перетяжка была идентифицирована на коротком плече 7 пары хромосом на большинстве проанализированных метафазных пластин (рис. 2, 3).

## Обсуждение

Результаты цитогенетического исследования *P. vespertinus* показали кариологическую однородность животных как из территории Харьковской, так и Запорожской областей. Их хромосомная формула идентична:  $2n = 12M + 12sM + 2sT = 26$ . Это может служить подтверждением того, что данный вид распространен на территории обеих исследуемых областей.

После описания кариотипа *P. fuscus* (Манило, Радченко, 2004) были проведены исследования с новых ранее не изученных регионов, в связи с чем база данных по кариологии вида была дополнена новыми материалами. Это послужило

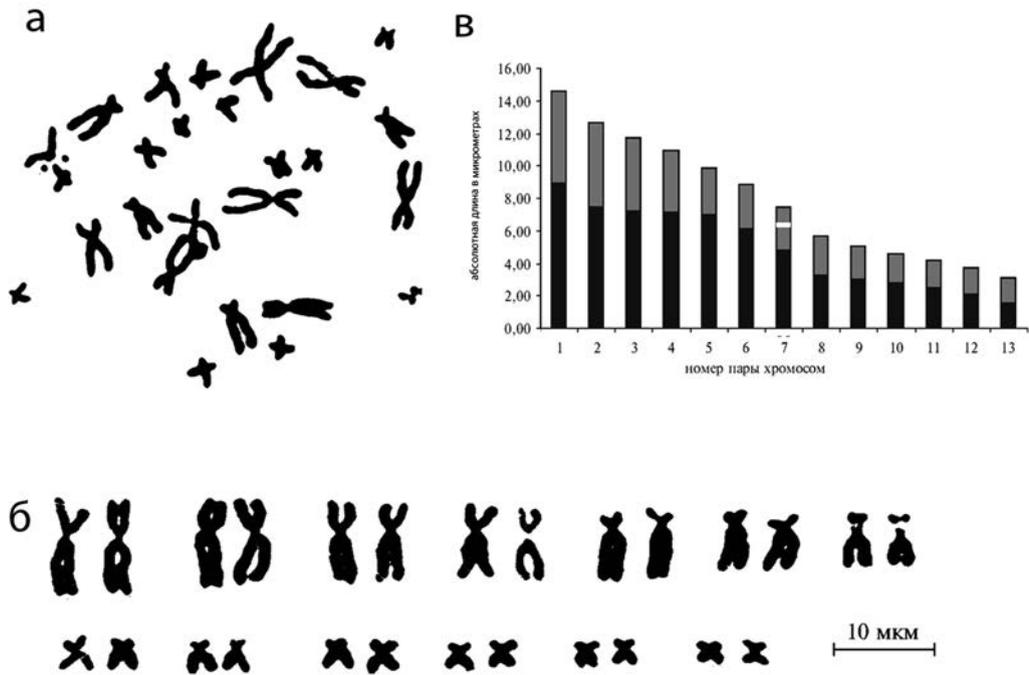


Рис. 1. Метафазная пластинка (а), кариограмма (б) и идиограмма (в) *Pelobates vespertinus* Запорожская обл., Харьковская обл.

Fig. 1. Metaphases plate (a), cariogramme (б) and idiogramme of caryotypes (в) *Pelobates vespertinus* Zaporizhzhya, Kharkov reg.

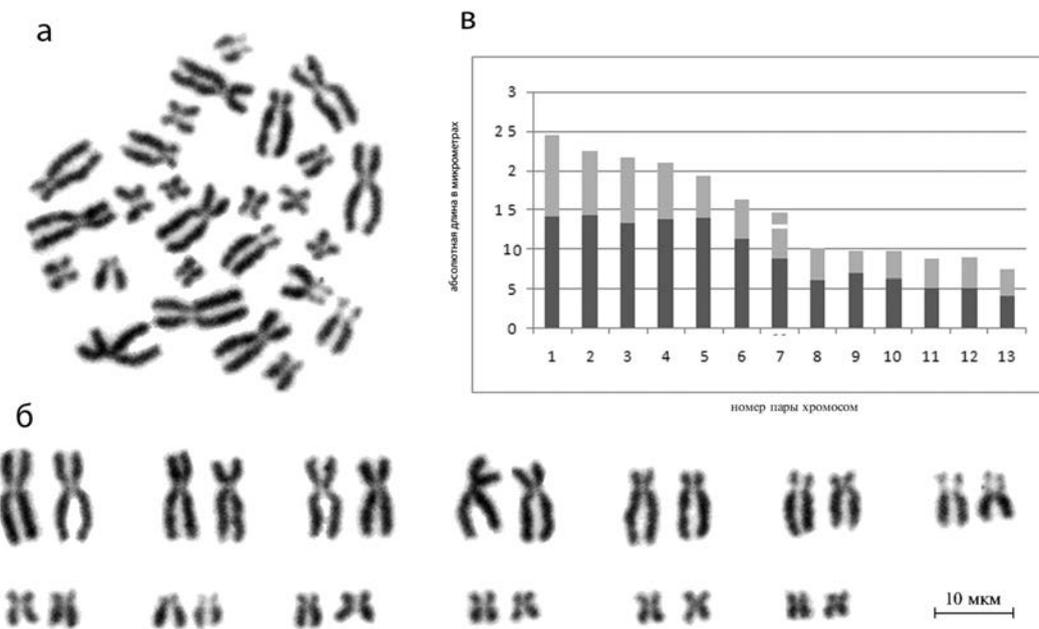
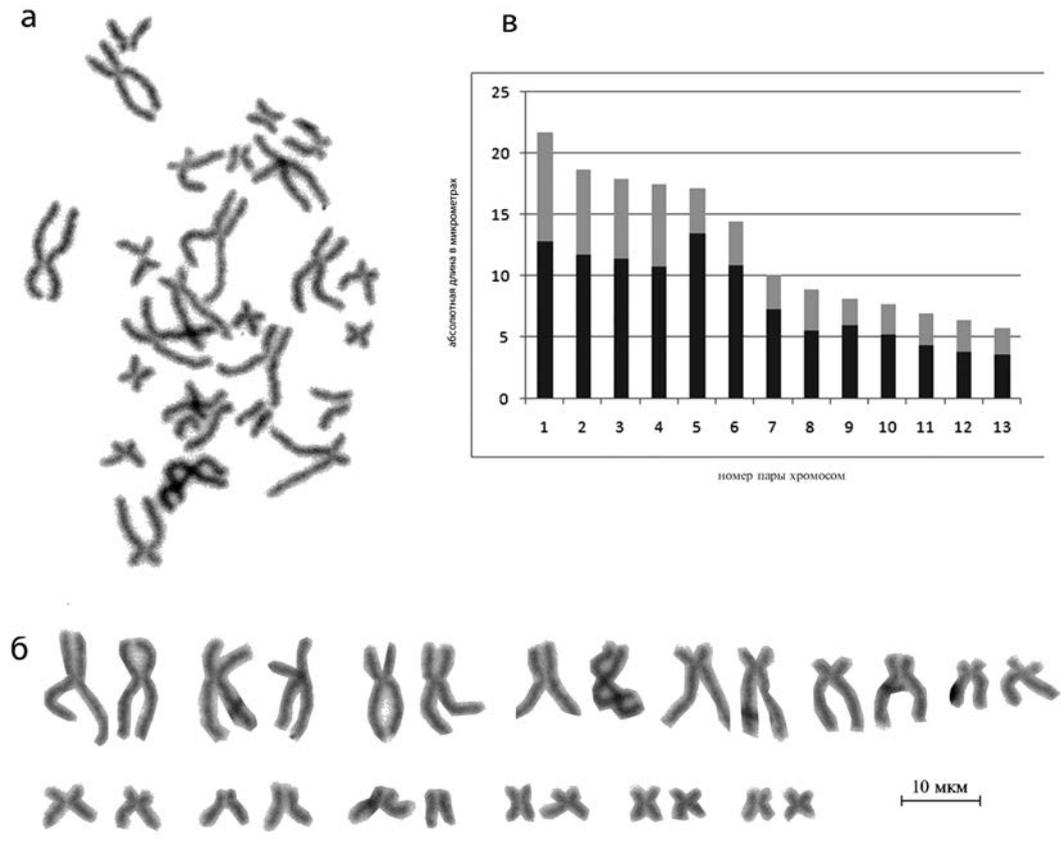


Рис. 3. Метафазная пластинка (а), кариограмма (б) и идиограмма (в) *Pelobates fuscus* Черниговской, Киевской обл.

Fig. 3. Metaphases plate (a), cariogramme (б) and idiogramme of caryotypes (в) *Pelobates fuscus* Chernihiv, Kiev region.



**Рис. 2.** Метафазная пластинка (а), кариограмма (б) и идиограмма (в) *Pelobates fuscus* Полтавской обл.

**Fig. 2.** Metaphases plate (а), kariogramme (б) and idiogramme of cariotypes (в) *Pelobates fuscus* Poltavskaya region.

причиной переопределения формы некоторых пар хромосом и изменения хромосомной формулы для особей из Черниговской и Киевской областей:  $2n = 16M + 10sM = 26$ .

Как показано выше кариотип *P. fuscus* из Полтавской обл. характеризуется появлением субтелоцентрической пары взамен метацентрической, характерной для этого вида из других исследованных точек ареала (Манило, Радченко, 2004), и которая присутствует в кариотипе чесночницы Палласа, то есть диплоидный набор особей *P. fuscus* из Полтавской области включает в себя часть хромосомных пар, характерных для кариотипа обыкновенной чесночницы и часть — чесночницы Палласа (табл. 1, рис. 1, 2, 3). Различия между выше описанными кариотипами обеих видов и кариотипом обыкновенной чесночницы из территории Полтавской области свидетельствуют о том что данный регион может быть зоной интерградации этих видов. Но это предположение требует дополнительных исследований с привлечением других методов и расширением зоны исследования как в Полтавской, так и других областях, на территории которых ареалы этих видов могут перекрываться.

Таким образом, сравнительно-кариологический анализ обыкновенной чесночницы и чесночницы Палласа показал, что описанные выше различия в морфологии нескольких пар хромосом и в первую очередь наличие в кариотипе чесноч-

ницы Палласа субтелоцентрической пары и ее отсутствие у обыкновенной чесночницы еще раз подтверждают их видовую самостоятельность.

Ранее (Манило, Радченко, 2004) нами описывался факт обнаружения вторичных перетяжек на коротком плече 7 пары хромосом на большинстве метафазных пластин *P. fuscus*. В результате данного исследования нами подтверждается наличие этого признака на большинстве проанализированных метафазных пластин, не только у обыкновенной чесночницы, но и у чесночницы Палласа.

- Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В. Г., Рустамов А.К., Щербак Н.Н., 1977. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. Учебн. пособие для студентов биол. специальностей пед. ин-тов. — М. : Просвещение. — 415 с.
- Кузьмин С.Л., 1999. Земноводные бывшего СССР. — М. : Товарищество научн. изданий КМК. — 298 с.
- Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Боркин Л.Я., Скоринов Д.В., 2008. Молекулярно-биохимические и цитогенетические аспекты микроэволюции у бесхвостых амфибий фауны России и сопредельных стран. Вопросы герпетологии : Материалы III съезда Герпетологического общества им. А.М. Никольского (Пушино, 9–13 октября 2006 г.). — Санкт-Петербург : Герпетологическое общество им. А.М. Никольского. — С. 247–257.
- Макгрегор Г., Варли Дж., 1986. Методы работы с хромосомами. — М. : Мир. — 262 с.
- Манило В.В., 1989. Кариологическое исследование рептилий / Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. — Киев : Изд-во АН УССР. — С. 100–109.
- Манило В.В., Радченко В.И., 2004. Сравнительно-кариологическое исследование «западной» формы обыкновенной чесночницы, *Pelobates fuscus* (Amphibia, Pelobatidae), из Киевской, Черниговской и Закарпатской областей Украины // Вестн. зоологии. — **38**, N 5. — С.91–94.
- Писанец Е.М., 2007. Амфибии Украины (справочник-определитель земноводных Украины и сопредельных территорий). — Киев : Зоологический музей ННПМ НАН Украины. — 312 с.
- Радченко В.И., Манило В.В., 2009. Сравнительно-кариологический анализ жаб рода *Bufo* (Anura, Amphibia) с территории Украины // Вестн. зоологии. — **43**, N 6. — С.575–781.
- Тарашук В.І., 1959. Земноводні та плазуни. Фауна України. Т. 7, вип. 1. — К. : Вид-во АН УРСР. — 245 с.
- Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Milto K.D., 2001. Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae): evidence from DNA flow cytometry // Amphibia-Reptilia. — **22**. — P. 387–396.
- Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Rosanov J.M., Khalturin M.D., Lada G.A., Borissovsky A.G., Faizulin A.I., Kotserzhinskaja I.M., Novitsky R.V., Ruchin A.B., 2003. New data on the distribution of two cryptic forms of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) in Eastern Europe // Russ. J. Herpetol. — **10**, N 3. — P. 111–118.
- Crochet P.A., Dubois A., 2004. Recent changes in the taxonomi of European amphibians and reptiles // Atlas of amphibians and reptiles in Europa ((2nd ed.) / Eds J. P. Gasc et al. — Paris : Societas Europaea Herpetologica & Museum National d’Histoire Naturelle. — P. 496–516.
- Crottini A., Andreone F., Kosuch J., Borkin L.J., Litvinchuk S.N., Eggert C. et al., 2007. Fossirian but widespread: the phylogeography of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*), and the role of the Po Valley as a major source of genetic variability // Molecular Ecology. — **16**. — P. 2734–2754.
- Kwet A., Nöllert A., 2009. Von Rössel von Rosenhof zum Froschlurch des Jares: Die Knoblauchkrote // Sekretär. — **9**. — S. 71–78.
- Litvinchuk S.N., Crottini A., Federici S., De Pous Ph., Donaire D., Andreone F., Kalezić M.L., Džukić G., Lada G., Borkin L.J., Rosanov J.M., 2013. Phylogeographic patters of genetic diversity in the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae), reveals evolutionary histiri, postglacial range expansion and secondary contact // Org. Divers Evol. — **13**. — P. 433–451.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A., 1964. Novenclosure for centromeric position on chromosomes // Hereditas. — **52**. — P. 201–220.

V.V. Manilo, O.N. Manuilova

COMPARATIVE KARIOLOGICAL RESEARCH OF TWO SPECIES OF SPADEFOOT TOADS  
*PELOBATES FUSCUS* AND *P. VESPERTINUS* (PELOBATIDAE, ANURA, AMPHIBIA)  
FROM TERRITORY OF UKRAINE

This work is dedicated to comparative kariological research of two species of spadefoot toads of fauna of Ukraine. Karyotypes of both species were described after calculating the brachial index and determine of each chromosome shape. Also their chromosomal formula were compiled: *P. fuscus* —  $2n = 16M + 10sM = 26$ ,  $NF = 52$ ; *P. vespertinus* —  $2n = 12M + 12sM + 2sT = 26$ ,  $NF = 52$ . Secondary constrictions are located on the short arm of 7<sup>th</sup> pair of chromosome for most of the studied metaphase plates. Karyotype of the common spadefoot toad in Poltava region differs from the karyotype of this species from other studied areas and Pallas spadefoot toad by morphology of some pairs of chromosomes. On the other hand, it has some similarities in the number of submetacentrics with common spadefoot toad and in the presence of a pair of subtelocentric with Pallas spadefoot toad:  $2n = 14M + 10sM + 2sT = 26$ ,  $NF = 52$ . This suggests that, Poltava region is a zone of intergradation of these species. However, this fact requires additional studies involving other methods with expansion of the study area.

Key words: karyotype, chromosome, metaphase plate, brachial index, species, taxonomy, habitat.

В.В. Маніло, О.М. Мануїлова

ПОРІВНЯЛЬНО-КАРІОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ДВОХ ВИДІВ ЗЕМЛЯНОК  
*PELOBATES FUSCUS* ТА *P. VESPERTINUS* (PELOBATIDAE, ANURA, AMPHIBIA)  
З ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Робота присвячена порівняльно-кариологічному дослідженню двох видів землянок фауни України. Після вирахування плечових індексів і визначення форми кожної хромосоми було зроблено опис каріотипів обох видів і виведені їх хромосомні формули: *P. fuscus* —  $2n = 16M + 10sM = 26$ ,  $NF = 52$  і *P. vespertinus* —  $2n = 12M + 12sM + 2sT$ ,  $NF = 52$ . Вторинні перетяжки на більшості досліджених метафазних пластинах розташовані на короткому плечі 7-ї пари хромосом. Каріотип звичайної землянки з території Полтавської області з одного боку відрізняється по морфології деяких пар хромосом від каріотипу як даного виду з інших досліджених областей, так і землянки Паласа, а з іншого — має деякі елементи подібності по кількості субметацентриків зі звичайною землянкою та наявністю субтелоцентричної пари з землянкою Паласа:  $2n = 14M + 10sM + 2sT = 26$ ,  $NF = 52$ . В зв'язку з цим можна висловити припущення, що по території Полтавської області проходить зона інтерградації даних видів, але цей факт потребує додаткових досліджень з використанням інших методів та розширенням зони дослідження.

Ключові слова: каріотип, хромосома, метафазна пластинка, плечовий індекс, вид, таксономія, ареал.