



УДК 597.8:576.316(477.52/6)

В.В. Манило, В.И. Радченко

Национальный научно-природоведческий музей НАН Украины,
ул. Б. Хмельницкого 15, Киев, 01601, Украина

E-mail: valentina_manilo@mail.ru

E-mail: radvikor@gmail.com

КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS* (ANURA, AMPHIBIA) ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ УКРАИНЫ

Исследованы хромосомные наборы 15 экземпляров озерных лягушек из Харьковской, Луганской и Донецкой областей Украины. Сравнительно-кариологический анализ показал, что по количеству хромосом диплоидные наборы исследованных особей и сделанных ранее из других мест Украины и сопредельных территорий не отличаются. Отмечена некоторая вариабельность морфологии мелких пар хромосом (на уровне субмета- и метацентрических), а также наличия и расположения вторичной перетяжки. Хромосомная формула: $2n = 8V + 14sV + 4sT = 26$, $NF = 52$. У 2 особей из Харьковской, 3 — Луганской и 1 — Донецкой областей на препаратах семенников, наряду с нормальными, присутствовали полиплоидные клетки на различных стадиях развития гамет (явление миксоплоидии).

Ключевые слова: хромосома, кариотип, вторичная перетяжка, гамета, плечевой индекс, миксоплоидия, экология.

Введение

К настоящему времени нами исследованы кариотипы всех бесхвостых земноводных Украины. Большой объем изученного материала (около 300 экземпляров) из 15 областей позволил получить для большинства видов достаточно обширные и достоверные кариологические данные (Манило, Радченко, 2008). Как сообщалось ранее (Манило, 2000; Манило 2005а, 2005б; Сурядная, 2005; Манило и др. 2007; Manilo, 2003, 2005в), при исследовании хромосомных наборов бурых (*Rana arvalis* и *Rana temporaria*) и зеленых (*Pelophylax ridibundus* и *Pelophylax esculentus*) лягушек из Житомирской, травяной лягушки (*R. temporaria*) из Закарпатской и съедобной (*P. esculentus*) лягушки из Харьковской областей Украины на препаратах семенников (на различных стадиях созревания половых клеток) была обнаружена миксоплоидия (смешанная полиплоидизация). Наличие этого явления в кариотипах лягушек из этих трех областей позволяет сделать предположение о связи данного хромосомного нарушения с влиянием некоторых негативных факторов внешней среды, характерных именно для этих областей. Тем более, что подобное объяснение укладывается в рамки уже опубликованных

© В.В. МАНИЛО, В.И. РАДЧЕНКО, 2010

выводов другими авторами из других регионов, работавших над проблемой влияния негативных факторов внешней среды на хромосомный аппарат животных (Шарыгин, 1980, 1983; Гилева и др., 1992; Глазко и др., 1996; Елисеева и др., 1996; Столина, Соломко, 1996; Гилева, 1997; Митrochenko та ін., 1999; Васильев и др., 2000).

Поскольку кариологические исследования озерной лягушки *P. ridibundus* из восточных областей Украины ранее не проводились, а при исследовании хромосомного набора съедобной лягушки *P. esculentus* из Харьковской области обнаружено не только явление миксоплоидии, но и несколько триплоидных экземпляров (Манило и др., 2007), то целесообразно продолжить цитогенетическое исследование комплекса зеленых лягушек из этого региона.

Данная работа посвящена описанию хромосомного набора *P. ridibundus* из восточных регионов Украины и проведению сравнительно-кариологического анализа полученных результатов с данными из других областей Украины и сопредельных территорий.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили сборы *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1971 2007–2008 гг. с территории Харьковской, Луганской, Донецкой и Полтавской областей Украины. Всего было исследовано 7 самцов, 7 самок и 1 ювенильный экземпляр (табл. 1).

Хромосомные препараты изготовлены методом раскапывания суспензии клеток крови, костного мозга и семенников (у одного животного из Луганской области были отдельно приготовлены кариопрепараты из ткани семенника и его полужидкого содержимого) по общепринятым методикам (King, Rofe, 1976; Макгрегор, Варли, 1986), с некоторыми модификациями (Манило, 1986, 1989). После периода старения (около 30 дней), препараты красились 2%-ным раствором красителя Гимза и исследовались с помощью микроскопа Primo Star (Karl Zeiss) и программы Axio Vision Rel 4.7 при увеличении 900 (объектив 90, окуляр 10). Для анализа отбирали метафазные пластинки с четкой морфологией хромосом и минимальным наложением одной хромосомы на другую. Всего было исследовано 866 метафазных пластин и гамет на 94 кариопрепаратах.

На препаратах крови и костного мозга исследовали хромосомы на стадии метафазы II митоза, а на препаратах семенников — делящиеся половые клетки 2-го и 3-го периодов их развития: пресперматогенез и все три стадии сперматогенеза (Рузен-Ранге, 1980).

Форму хромосом определяли по классификации А. Левана с соавторами (Levan et al., 1964).

Описание кариотипа производили по таким параметрам: общее количество хромосом на метафазной пластине, определение формы хромосом, вычисление общей длины кариотипа, плечевого индекса, наличие вторичных перетяжек и определение формы бивалентов диакинеза.

Результаты

В результате цитогенетического исследования препаратов крови и костного мозга *P. ridibundus* установлено, что кариотип всех особей включает одинаковое количество двуплечих хромосом ($2n = 26$) и имеет одинаковое основное число ($NF = 52$). Хромосомная формула: $2n = 8V + 14sV + 4sT = 26$. **Короткое плечо 2-й пары и длинное плечо 9-й пары хромосом на большинстве метафазных пластин имеют вторичную перетяжку** (рис. 1a, b, рис. 2; табл. 1, 3).

Изучение препаратов семенников на стадии метафазы I (диакинеза), метафазы II мейоза показало, что у животного из Полтавской области все делящиеся клетки содержали нормальный гаплоидный набор хромосом ($n = 13$), полиплоидные клетки не выявлены, а у озерных лягушек из Харьковской, Луганской и Донецкой областей количество хромосом варьировало от $n = 13$ (гаплоидный набор) до $4n = 52$ (тетраплоидный набор) (рис. 1c, d, e). Биваленты диакинеза, соответствующие всем крупным и большинству мелких хромосом, имели форму колец, число мелких бивалентов, имеющих палочковидную форму, варьировало от 2 до 4. Доля полиплоидных клеток составляла около 20%.

Делящиеся клетки на стадии пресперматогенеза (метафазы II митоза) имели как нормальный набор хромосом $2n = 26$, так и полиплоидный $3n = 39$, $4n = 52$ и т. д. (рис. 1a, b, табл. 1), кроме того незначительный процент клеток содержал неполный набор хромосом (явление анеуплоидии). Все полиплоидные клетки имели кратное увеличение гаплоидного набора ($n = 13$) и не отличались по форме хромосом от стандартного кариотипа. Доля полиплоидных митотических клеток значительно ниже чем мейотических (около 10%). На препаратах семенной жидкости делящиеся клетки получить не удалось, а на препаратах тела семенника присутствовали все типы полиплоидных наборов хромосом — и митотические и мейотические (рис. 1, табл. 1).

Обсуждение

Описание кариотипа озерных лягушек с востока Украины по морфологическим параметрам хромосом практически не отличается от сделанного нами ранее из Житомирской области (Манило, 2005a, 2005b; Manilo, 2003, 2005b) и совпадает с описанием Н. Сурядной из других областей Украины (Сурядная, 2003), хотя некоторая вариабельность морфологии отдельных пар хромосом, плечевого индекса и наличие и локализация вторичных перетяжек все же наблюдается. Так, 7-я и 8-я пары в кариотипе озерной лягушки из Житомирской области субметацентрические, а из восточных популяций — мета- и суббелоцентрические соответственно (табл. 2, 3). Вторичная перетяжка в кариотипе из Житомирской области расположена на коротком плече 2-й и длинном плече 8-й пар (Манило, 2005a), по данным Н. Сурядной (2003) с юга Украины — на длинном плече 9-й пары, а у особей из восточных популяций — на коротком плече 2-й и длинном плече 9-й пар хромосом (рис. 1a, b, рис. 2).

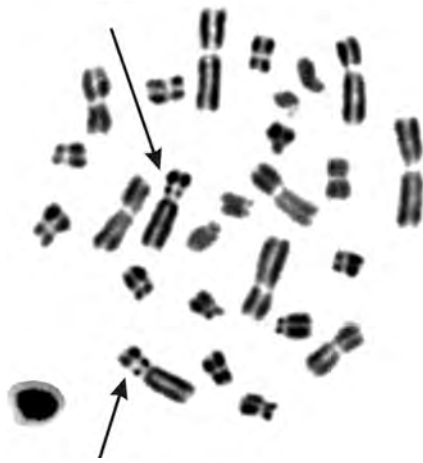
Сравнительный анализ полученных результатов с результатами других авторов из сопредельных территорий (Александровская, 1976; Иванов, Мадянов, 1973; Кайбелева, 2004; Günter, 1979; Koref-Santibanez, 1979; Meszaros, Bartos, 1978) показал также некоторую вариабельность формы хромосом и локализации вторичных перетяжек (табл. 3). Это может быть связано с разной степенью спирализации исследуемых хромосом, а также с различной методикой их промеров.

Таблица 1. Характеристика исследуемого материала
Table 1. Characteristics of the studied material

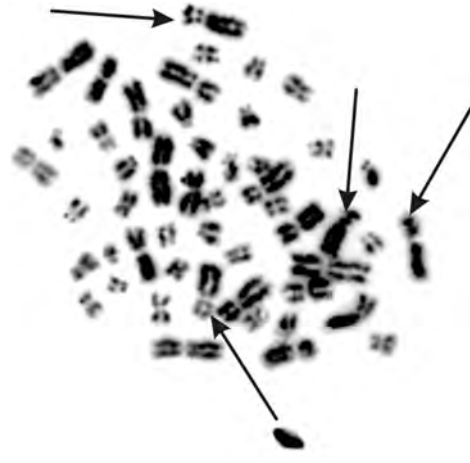
№ п/п	№ препарата	Место сбора	Пол	Исследуемая ткань	Гаметы (количество бивалентов, хромосом)	Диплоидный набор	Полиплоидный набор	Характеристика кариотипа
1	648	Полтавская обл., окр. г. Великая Богачка	М	КМ С	13	26		
2	651	Харьковская обл., окр. г. Балаклея	F	КР		26		
3	652	Харьковская обл., окр. г. Балаклея	F	КР		26		
4	653	Харьковская обл., окр. г. Балаклея	М	КР С	13,26	26	39,52,144	Миксоплоидия
5	660	Харьковская обл., окр. г. Балаклея	F	КР КМ		26		
6	661	Харьковская обл., окр. г. Балаклея	М	КР С	13,26	26		Миксоплоидия
7	673	Харьковская обл., окр. пгт. Краснокутск	F	КР КМ		26	Нет делящихся клеток	
8	686	Луганская обл., окр. пгт. Кременная	F	КР		26		

9	689	Луганская обл., окр. пгт. Кременная	М	КР	26	26	Миксоплоидия
10	690	Луганская обл., окр. пгт. Кременная	F	КР	13,26,52	26	Нет делящихся клеток
11	691	Донецкая обл., Северский р-н, окр. с. Ильичевка	М	КР	31,26	26	Нет делящихся клеток
12	700	Харьковская обл., Двуреченский р-н, окр. с. Красное	F	КР	26	26	Нет делящихся клеток
13	709	Луганская обл., Станично-Луганское	JUV	КР	26	26	Миксоплоидия
14	712	Луганская обл., Станично-Луганское	М	КМ	13,26	26	Миксоплоидия
15	714	Луганская обл., окр. с. Счастье	М	КМ	13,26,39	26	Миксоплоидия

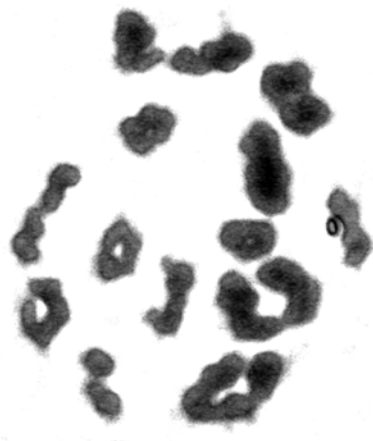
Примечание. Исследуемая ткань: КМ — костный мозг; С — семенник; КР — кровь; М — самец; F — самка; JUV — неполовозрелая особь.



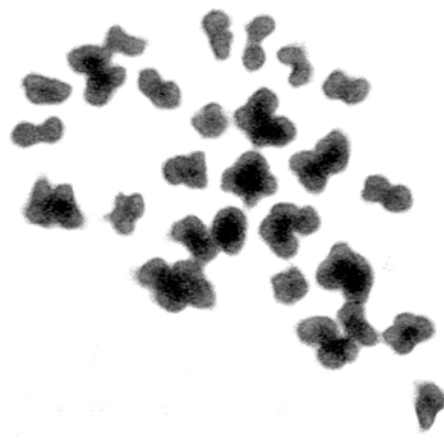
a — метафаза II митоза
(диплоидный набор, $2n = 26$), препарат № 689



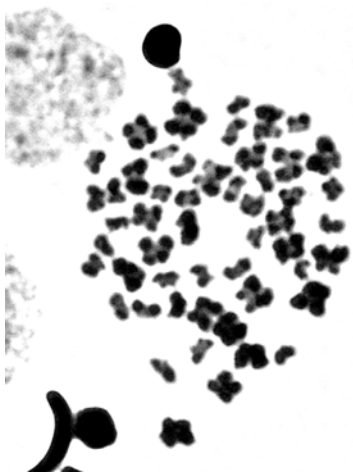
b — метафаза II митоза
(тетраплоидный набор, $4n = 52$), препарат № 714



c — метафаза I мейоза
(гаплоидная гамета, $n = 13$), препарат № 689



d — метафаза II мейоза
(диплоидная гамета, $2n = 26$), препарат № 689



e — метафаза II мейоза
(тетраплоидная гамета, $4n = 52$), препарат № 689

Рис. 1. Делящиеся клетки *P. ridibundus* (стрелками указаны хромосомы со вторичными перетяжками)

Fig. 1. Dividing cells of *P. ridibundus* (arrows indicate chromosomes with secondary constrictions)

Таблица 3. Плечевые индексы *P. ridibundus* с разных участков ареала
 Table 3. Arm rations *P. ridibundus* from different parts of the range

Место исследования	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Вт. пер. № пары / плечо	Автор
Россия (Волга)	V	SV	SV	SV	V	V	ST	SV	SV	SV	—	—	—	9 / дл	Кайбелева, 2004
Хвалынский	V	SV	SV	SV	V	V	SV	—	V	ST	V	SV	SV	9 / дл	Кайбелева, 2004
Россия	V	SV	SV	V	V	V	—	SV	SV	ST	—	—	—	9 / дл	Александровская и др., 1976
Россия	V	SV	SV	SV	V	V	V	V	SV	SV	SV	SV	SV	11	Иванов Мадьянов, 1973
Украина	V	SV	SV	SV	V	V	V	ST	ST	SV	SV	SV	SV	9 / дл	Сурядная, 2003
Украина (Житомир)	V	SV	SV	SV	V	V	SV	SV	ST	SV	ST	SV	SV	9 / дл	Манило, 2005
Наши данные	V	SV	SV	SV	V	V	SV	ST	ST	SV	SV	SV	SV	2 / к 8 / дл	Наши данные
Германия	V	V-SV	V-SV	SV	V	V	V	V	ST-SV	ST-SV	V	SV	SV	10 / дл	Koref-Santibañez, 1979
Венгрия	V	SV	SV	V	V	V	V	ST	ST	SV	V	SV	SV	—	Mészáros, Bártos, 1978
Германия	V	SV	SV	SV	V	V	V	ST	ST	SV	V	SV	SV	10 / дл	Günther, 1970

Если действующие на животное вещества, вредные с точки зрения экологии, способны повлиять на процесс митотического, а затем и мейотического делений таким образом, что поделившиеся хромосомы объединятся в одно ядро и останутся в материнской клетке вместо создания двух дочерних, то в конечном результате пloidность полученной, либо митотической клетки, либо гаметы будет зависеть от количества нерасхождений хромосом. Как уже упоминалось выше, появление подобных хромосомных нарушений большинство авторов связывает с воздействием различных неблагоприятных факторов, но, например, С. Буччи с соавт. (Bucci et al., 1990) считают, что появление полиплоидных клеток (32% исследованных) в ооцитах самок *R. esculenta* с территории Польши связано со специфичностью прохождения гаметогенеза у данного вида. Ранее мы также высказывали подобное предположение, но оно может быть рассмотрено только как одно из возможных вариантов объяснения миксоплоидии, поскольку в доступной нам литературе, в том числе и по развитию половых клеток у амфибий, о какой-либо специфичности сперматогенеза и оогенеза не упоминается. Таким образом, и природа миксоплоидии, и механизмы ее возникновения по-прежнему остаются не выясненными и требуют дальнейшего исследования.

Выводы

Диплоидный набор озерной лягушки из восточных областей Украины включает 26 двуплечих хромосом ($2n = 26$, $NF = 52$) и по этим параметрам он не отличается от всех предыдущих описаний.

Основные различия между кариотипом из восточных популяций *P. ridibundus* и данными других авторов из других областей Украины и сопредельных территорий связаны с морфологией отдельных мелких пар хромосом (количество и расположение в кариограмме), а также с наличием и расположением вторичных перетяжек.

Главной версией при объяснении механизма возникновения миксоплоидии следует считать, по нашему мнению, влияние различного рода физических и химических мутагенов, хотя другие версии, связанные с особенностями гаметогенеза, также имеют право на существование.

Присутствие на препаратах тела семенника у животного № 689 полиплоидных клеток и митотического и мейотического деления свидетельствует о том, что процесс нерасхождения дочерних клеток и накопление их в материнских может происходить на всех стадиях созревания половых клеток.

Александровская Т.О. К систематике зеленых лягушек Московской области // Зоол. журн. — 1976. — 55, вып. 9. — С. 1362–1367.

Васильев А.Г., Боев В.М., Гилева Э.А. и др. Отдаленные эколого-генетические последствия радиационных инцидентов: Тоцкий ядерный взрыв (Оренбургская область, 1954 г.). — Екатеринбург: Изд-во «Екатеринбург», 2000. — 288 с.

Габаева Н.С. Современные проблемы сперматогенеза. — М.: Наука, 1982. — 259 с.

Гершензон С.М. Основы современной генетики. — К.: Наук. думка, 1983. — 558 с.

Гилева Э.А. Эколого-генетический мониторинг с помощью грызунов (уральский опыт). — Екатеринбург: Изд-во Уральского университета, 1997. — 105с.

Гилева Э.А., Большаков В.Н., Косарева А.Т., Габитова А.Т. Частота хромосомных нарушений у синантропных домовых мышей как показатель генотоксического эффекта загрязнения среды // Докл. АН СССР. — 1992. — 325, № 5. — С. 94–97.

Глазко Т.Т., Бунтова Е.Г., Глазко Г.В., Созинов А.А., Сафонова Н.А., Гетерогенность цитогенетической изменчивости в клетках костного мозга лабораторных и диких грызунов в условиях зоны отчуждения Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика. — 1996. — 30, № 4. — С. 25–34.

- Елисеєва К.Г., Картель Н.А., Войтович А.М., Трусова В.Д., Огурцова С.Э., Крупнова Э.В. Хромосомные аберрации в различных тканях мышевидных грызунов и амфибий из загрязненных радионуклидами районов Беларуси // Цитология и генетика. — 1996. — **30**, № 4. — С. 20–24.
- Иванов В.Г., Мадянов Н.Н. Сравнительная кариология лягушек рода *Rana* // Цитология. — 1973. — **15**, № 7. — С. 920–928.
- Ильенко А.И., Крапивко Т.П. Экология животных в радиационном биогеоценозе. — М: Наука, 1989. — 224 с.
- Кайбелева Э.И., Завъялов Е.В., Табачишин В.Г. Эколога-кариологические особенности озерных лягушек севера Нижнего Поволжья // Поволжский экологический журнал. — 2004. — № 3. — С. 318–319.
- Макгрегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных. — М.: Мир, 1986. — 272 с.
- Манило В.В. Кариотипы гекконов родов *Alsophylax* и *Crossobamon* // Вестн. зоологии. — 1986. — № 5. — С. 46–54.
- Манило В.В. Кариологическое исследование рептилий // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. — К.: Ин-т зоологии АН УССР, 1989. — С. 100–109.
- Манило В.В. Поліплоїдія — екологічний сигнал // Вісн. Нац. акад. наук України. — 2000. — № 5. — С. 52–53.
- 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.М. Писанець. — К.: «Велес», 2005а. — С. 99–104.
- Манило В.В. Хромосомные нарушения (миксоплоидия) у бурых лягушек (Anura, Amphibia) из некоторых областей Украины // Зб. праць Зоол. музею. — 2005б. — № 37. — С. 100–108.
- Манило В.В., Радченко В.И. Кариологическое исследование бесхвостых земноводных Украины // Праці Укр. Герпетол. т-ва. — 2008. — № 1. — С. 29–38.
- Манило В.В., Радченко В.И., Коршунов А.В. Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl esculenta*) из Харьковской области Украины // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. — 2007. — **21**. — С. 68–73.
- Митроченко В.В., Кириченко О.И., Кучма М.Д. Вплив проникаючої радіації на лісові насадження. // Основи лісової радіоекології. — К.: Держгослісгосп України, 1999. — С. 52–80.
- Рузен-Ранге Э. Сперматогенез у животных. — М.: «Мир». — 1980. — 255с.
- Столина М.Р., Соломко А.П. Влияние хронического ионизирующего облучения в малых дозах на ряд показателей репродуктивной функции мышей линии **CC57W/Mv** из **чернобыльской экспериментальной** популяции // Цитология и генетика. — 1996. — **30**, № 1. — С. 53–58.
- Сурядная Н.Н. Материалы по кариологии зеленых лягушек (*Rana ridibunda* Pallas, 1771; *Rana lessonae* Camerano, 1882; *Rana esculenta* Linneus, 1758) с территории Украины // Вестн. зоологии. — 2003. — **37**, № 1. — С. 33–40.
- Шарыгин А.С. Содержание микроэлементов в организме остромордой лягушки: Матер. III Всесоюз. совещ. «Вид и его продуктивность в ареале». — Вильнюс, 1980. — С. 78–80.
- Шарыгин А.С. Геохимическая экология и полиморфизм некоторых амфибий и рептилий // Физиологическая и популяционная экология. — Саратов: Из-во СГУ, 1983. — С. 41–43.
- Bucci S., Raghianti M., Mancino G. et al. Lampbrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing hybrid *Rana esculenta* find its parental species // J. Exp. Zool. — 1990. — **255** (1). — P. 37–56.
- Günther R. Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pal. Und Vorkommen von Triploide bei *Rana esculenta* L. (Anura, Amphibia) // Biol. Zbl. — 1970. — **89**. — S. 327–342.
- King M., Rofe R. Karyotypic Variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Grey) (Gekkonidae: Reptilia) // Chromosoma (Berl.). — 1976. — **54**. — P. 75–87.
- Koref-Santibañez S. The karyotypes of *Rana lessonae* Camerano, *Rana ridibunda*, *Rana esculenta* // Mitt. Zool. Berlin. — 1979. — **55**, N 1. — P. 115–124.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes // Hereditas. — 1964. — N 52. — P. 201–220.
- Manilo V. V. Cases of mixed poliploidization in cariotypes of brown frogs of Ukraine // 12-th Ordinary General Meeting Societas Europea herpetological (SHE). — St. Peterburg, 2003. — P. 103.
- Manilo V. V. Cases of mixoploidy in brown frogs of Ukraine // Herpetologia Petropolitana: Proc. of the 12 Ordinary General Meeting / Ed. N. Ananjeva, O. Tsinenko. — St. Peterburg, 2005. — P.61–63.
- Mészáros B., Bártos L.A. *Rana esculenta-formakkor* három magyarorszag alakjanak kariological feldolgazasa // Acta Biol. Debres. — 1978. — **15**. — P. 239–256.

В.В. Маніло, В.І. Радченко

КАРИОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*
(ANURA, AMPHIBIA) СХІДНОЇ ЧАСТИНИ УКРАЇНИ

Досліджені хромосомні набори у 15 екземплярів озерних жаб з Харківської, Луганської та Донецької областей України. Порівняльно-каріологічний аналіз показав, що за кількістю хромосом диплоїдні набори досліджуваних особин та тих, які були зроблені раніше з інших місць України та суміжних територій, не відрізняються. Відзначена деяка варіабельність морфології дрібних пар хромосом (на рівні субмета- та метацентричних), а також наявності та локалізації вторинних перетяжок. Хромосомна формула: $2n = 8V + 14sV + 4sT = 26$, $NF = 52$. У 2 особин з Харківської, 3 — Луганської та 1 — Донецької областей на препаратах сім'яників, поруч з нормальними, були присутні поліплоїдні клітини на різних стадіях розвитку гамет (явище міксоплоїдії).

Ключові слова: хромосома, каріотип, вторинна перетяжка, гамета, плечовий індекс, міксоплоїдія, екологія.

V.V. Manilo, V.I. Radchenko

KARYOLOGICAL STUDY *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*
(ANURA, AMPHIBIA) OF THE EAST PART OF UKRAINE

Chromosome sets of 15 specimens of lake frogs from Kharkiv, Lugansk and Donetsk regions of Ukraine are investigated. Comparative karyological analysis of the results showed that number of chromosomes in the diploid karyotypes of the studied species and of made previously from other areas of Ukraine and adjacent territories are not differ one from another. Noted some variability in the morphology of small pairs of chromosomes (at the level submeta-metacentric), as well as the availability and dissemination of secondary constrictions. Chromosomal formula: $2n = 8V + 14sV + 4sT = 26$, $NF = 52$. From 2 specimens of Kharkov, 3 — Lugansk and 1 — Donetsk region, on the preparations of the testes, together with the normal, polyploid cells were present at various stages of development of gametes (a phenomenon mixoploidy).

Key words: chromosome, karyotype, secondary constrictions, gamete, the brachial index, mixoploidy, ecology.