



УДК 597.8:575.853

**Н. Н. Сурядная**

Мелитопольский институт экологии  
и социальных технологий университета «Украина»,  
ул. Интеркультурная, 380, г. Мелитополь, 72316, Украина.  
E-mail: suriadna@ukr.net

## МОРФОЛОГИЯ ХРОМОСОМ ТРИПЛОИДНЫХ *PELOPHYLAX ESCULEN-* *TUS* (ANURA, RANIDAE) УКРАИНЫ

В результате проведенных исследований были обнаружены новые точки находок трех триплоидных особей *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) на территории восточной Украины. Доля триплоидов в популяциях составляет 1,2 %. Триплоидные *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) имеют симметричный кариотип, все хромосомы двуплечие, включают 15 крупных и 24 мелких хромосомы — 9 мета- (m) + 24 субмета- (sm) + 6 субтелоцентрика- (st),  $3n = 39$ , N. F. = 78. По относительной длине достоверных отличий между диплоидными и триплоидными *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) не наблюдается, но кариотипы достоверно отличаются 6–7-й парами, что может говорить об особой эволюционной роли некоторых отдельных хромосом. Установлена достаточно низкая частота (менее 10 %) проявления вторичных перетяжек у триплоидов. Триплоидный кариотип характеризуется определенной неустойчивостью. Диплоидный кариотип более стабилен. На отдельных метафазных пластинках одинаковые типы хромосом или их гомологи варьируют по длине, характерно наличие неполных наборов, пределы изменчивости хромосомных параметров указывают на разную типизацию хромосом, в отличие от общего среднего значения, что говорит о своеобразной гетероморфности триплоидного кариотипа.

К л ю ч е в ы е с л о в а: хромосомы, кариотип, триплоид, диплоид, *Pelophylax esculentus*, Украина.

### Введение

Вопрос полиплоидизации генома комплекса зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) все время находится в центре внимания ведущих ученых. В контексте сложных процессов видообразования аллотриплоиды являются довольно распространенным явлением данного рода. В настоящее время нет убедительных доказательств существования стабильных триплоидных форм, хотя спонтанно возникающие особи известны (Litvinchuk et al., 2015). При этом следует помнить, что генетические различия между видами, популяциями или формами с неясным таксономическим статусом могут варьировать в широком диапазоне.

*Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) на сегодня используется как модельный объект для изучения процессов гибридизации и полиплоидии в контексте сложных процессов видообразования комплекса зеленых лягушек. Постоянно обсуждается вопрос происхождения триплоидных гибридов и их роль в гибридогенном видообразовании. Известно, что геном *Pelophylax esculentus* (LR), состоит из геномов двух родительских видов: *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) — генотип LL и *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) — генотип RR. Гибриды имеют разное происхождение

© Н. Н. СУРЯДНАЯ, 2015

ние и включают в себя огромное разнообразие родительских геномов (Hoffmann et al., 2015).

К сожалению, работ, которые подтверждали бы триплоидность особей на хромосомном уровне недостаточно. В основном определение триплоидов базируется на размерах генома или результатах современных молекулярно-генетических методов. Благодаря последним триплоиды описаны с территории восточной Украины (Borkin et al., 2004; Боркин и др., 2005; Шабанов и др., 2006). Здесь был установлен факт массовой полиплоидии особей *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) по размеру генома, что позже подтверждено на хромосомном уровне (Манило и др., 2007).

При этом остается открытым вопрос о детальной морфологии хромосом триплоидов. Данный анализ актуален, поскольку есть необходимость определить какую эволюционную роль каждая пара хромосом или ее отдельные элементы (гомологи, плечи, перетяжки, структурные элементы, комплексные хромосомные показатели) могут играть в гибридогенном видообразовании и в чем специфика их изменчивости или стабильности. На фоне консервативности хромосом количество ДНК достаточно сильно варьирует у амфибий. Как это сказывается на морфологии кариотипов, на сегодня не выяснено, особенно когда речь идет о таком сложном комплексе с нетрадиционными процессами видообразования, где триплоидные гибриды играют особую роль.

#### Материал и методы исследования

Сбор и кариотипирование материала проводили достаточно длительное время (1996–2016 гг.). Триплоидные гибриды были определены на хромосомном уровне по наличию триплоидных метафазных пластинок. Здесь следует особо подчеркнуть. Для достоверного определения триплоидности по метафазам необходимо наличие пяти и больше полных пластинок ( $n=39$ ) на одном предметном стекле. Допускаются минимальные потери гомологов (один–два).

Для приготовления хромосом использовано 245 особей (202 самцов, 43 самок) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) из 31 выборки на территории Украины (Винницкая, Волынская, Днепроовская, Житомирская, Закарпатская, Киевская, Луганская, Николаевская, Одесская, Полтавская, Харьковская, Херсонская, Черкасская, Черновицкая обл.). В статье приводится детальное описание морфологии хромосом триплоидных *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) ( $3n$ ) и их сравнение с нормальным диплоидным кариотипом ( $2n$ ).

Приготовлено и просмотрено 1128 кариопрепаратов (кровь — 156; костный мозг — 464; семенники — 508). Проанализировано более 725 метафазных пластинок и 52 кариограммы ( $3n = 17$ ,  $2n = 35$ ), морфологически обработано  $3n = 9$  метафазных пластинок,  $2n = 22$ .

Соответствие пар гомологичных хромосом производили визуально, по их размерам и на основании положения центромеры, базируясь на хромосомных показателях. Для фотографий отбирали пластинки с четкой морфологией хромосом и минимальным количеством накладок. Хромосомные препараты готовили по стандартной методике (Макгрегор, Варли 1986). Особенности обработки метафазных пластинок и кариотипов детально описаны нами ранее (Сурядная, 2003; Suryadnaya, 2014). При этом следует подчеркнуть, что промеряли по четыре плеча каждого гомолога. Типы хромосом определяли по усредненному показателю с указанием стандартной статистической ошибки. Достоверность различий проверяли с помощью индекса Колмогорова-Смирнова. В подобных исследованиях при кариотипировании хромосом необходимо давать в работе саму метафазную пластинку, с которой делается раскладка, это крайне необходимо для достоверности представленных кариограмм и, соответственно представляемых результатов.

Плечи хромосом со вторичными перетяжками измеряли цельно. При анализе рассматривали все параметры хромосом. Типология была определена согласно общепринятой классификации (Levan et. al., 1964; Макгрегор, Варли 1986).

Кариопрепараты просматривали на бинокулярном 4-объективном микроскопе KONUS #5306 CAMPUS 1000X, фотографировали цифровой камерой Digital Camera for Microscope DCM300 (5 Mpixels) с использованием программы ScopePhoto. Редактирование снимков и измерения проводили с помощью программ Photoshop и ImageJ. Препараты хранятся в личной коллекции автора (г. Мелитополь).

### Результаты

В результате проведенных исследований нами были обнаружены три триплоидные особи *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) в двух из 31-й выборки на территории Украины. Все остальные исследуемые животные как гибриды, так и родительские виды имели нормальный диплоидный кариотип ( $2n = 26$ ), при этом широко распространена частичная смешанная поли-, анеуплоидизация отдельных клеток, о чем мы писали ранее (Сурядная, 2012).

В первую очередь, отметим, что это новые точки находок триплоидной *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) в зоне массовой полиплоидии, и в целом они расположены в пределах территории, где триплоиды были описаны ранее (Borkin et. al., 2004; Боркин и др., 2005). О находке триплоидных *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), в частности на востоке Украины, мы писали ранее, где достаточно подробно описаны биотопы исследуемых популяций и особых предпочтений по экологии и морфологии описанных триплоидов не обнаружено (Сурядная, 2010). Обе выборки представлены популяционной системой RE-типа.

Один самец и одна самка (2 особи) с триплоидным кариотипом обнаружены в окр. с. Снежковка, Изюмского р-на Харьковской области ( $49^{\circ}10'$  с. ш.,  $37^{\circ}14'$  в. д.). Дополнительные исследования позволили уточнить долю триплоидов в этой выборке и данный показатель составил 4,6 %, а по отношению к числу гибридных особей 10 % ( $n = 43$  ос., *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) — 20 ос., *P. ridibundus* (Pallas, 1771) — 23 ос.). Одна триплоидная самка выявлена в окр. с. Метелкино, Северодонецкого р-на Луганской обл. ( $48^{\circ}56'$  с. ш.,  $38^{\circ}33'$  в. д.). Мы уже отмечали достаточно низкую численность исследуемых животных в данном биотопе ( $n = 4$  ос., *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) — 2 ос., *P. ridibundus* (Pallas, 1771) — 2 ос.). Из четырех, с трудом добытых особей, одна самка оказалась триплоидной. К сожалению, уточнить и дополнительно провести исследования в данной точке нам не удалось, поэтому доля триплоидов составила 25 %, по отношению к числу гибридных особей — 50 % (Сурядная, 2010). Это достаточно высокий показатель, и к этим данным надо относиться с осторожностью, поскольку выборка не репрезентативная и требует проверки на большем материале.

В целом среди всех проанализированных особей *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) территории Украины ( $n = 245$ ) доля триплоидов составила чуть больше 1 % (1,2 %).

Детальное изучение морфологии хромосом показало следующие результаты. Триплоидные *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), как и все виды гибридогенного комплекса, имеют симметричный кариотип, все хромосомы двуплечие (рис. 1–3).

Хромосомный набор включает 15 крупных и 24 мелких хромосомы, которые можно представить в виде 13 групп, так называемых триад, по 3 хромосомы в каждой, с определенной морфологической спецификой (рис. 1).

В первую очередь, отметим своеобразную гетероморфность хромосом триплоидов, потерю некоторых гомологов (неполный наборы), и достаточно вариативные размерные показатели.

Группа крупных хромосом представлена метацентрическими и субметацентрическими хромосомами. Первая триада гомологов — метацентрики, центромерный индекс в среднем варьирует в пределах 40–46 % (табл. 1, рис. 1). На некоторых пластинках (до 40 % просмотренных метафаз) 3-й гомолог может быть относительно субметацентричным. Такая же, своего рода, гетероморфность может встречаться и на пластинках с нормальным кариотипом ( $2n = 26$ ), но доля их в половину меньше (20 %). Первый гомолог по размерным характеристикам — самый крупный, что также характерно (около 15 %) и для диплоидных метафаз, но в большей



**Рис. 1.** Метафазные пластинки и кариограммы триплоидной *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).

**Fig. 1.** Metaphase plates and karyograms triploid of *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).

степени гомологи 1-й пары практически одинаковы по размерам. Крайне редко теряются гомологи 1-й пары, по нашим данным на одной пластинке у триплоида и диплоида не было по одному гомологу.

Вторая, третья и четвертая триада гомологов — субметацентрические с центромерным индексом — 36–39 %. На некоторых метафазах гомологи этих групп могут быть разных размеров. Четвертая триада более метацентрична. Вторичная перетяжка на третьей паре не обнаружена. На двух пластинках из 9 промеренных установлена потеря последнего гомолога 3-й триады. Среди диплоидов на одной пластинке вторая пара была без одного гомолога.

Среди пятой триады гомологов метацентрического типа также встречается определенная гетероморфизация хромосом. Первый гомолог может быть субметацентриком, чаще у диплоидов. Последний гомолог среди крупных хромосом — самый мелкий (табл. 1). Две пластинки у триплоидов и две у диплоидов не имели третьего гомолога пятой пары. Кроме того, у диплоидных гибридов на двух пластинках обнаружен лишний третий гомолог пятой пары. Такая трисомия, достаточно редкое явление в кариотипе зеленых лягушек (Сурядная, 2012), у триплоидов не обнаружена.

Таблица 1. Параметры хромосом триплоидных (3n) и диплоидных (2n) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758)

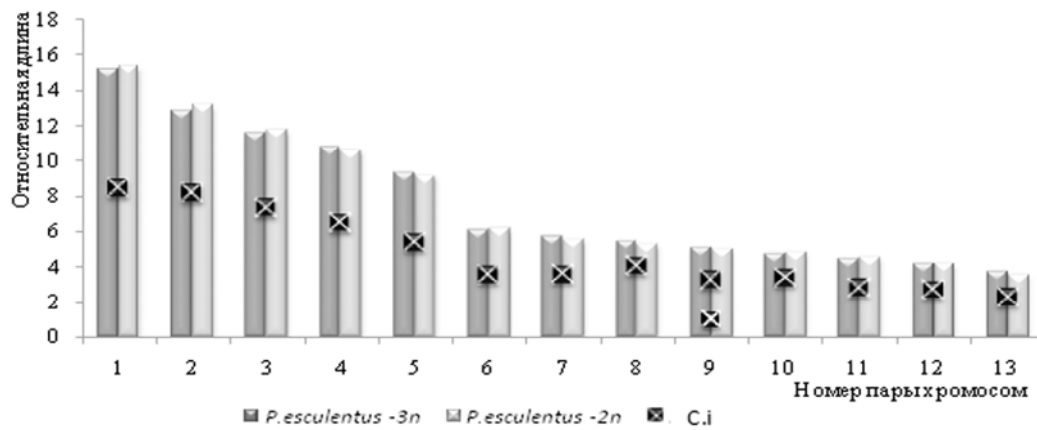
Table 1. Chromosomes parameters in 3n and 2n *P. esculentus* (Linnaeus, 1758)

Номер хромосомы	Вид	Длинное плечо, М ± m (min-max), нм	Короткое плечо, М ± m (min-max), нм	Общая длина хромосомы, М ± m (min-max), нм	Относительная длина (R. L.), М ± m (min-max)	Плечевой индекс (A. R.), М ± m (min-max)	Центромерный индекс (Ci.), М ± m (min-max)	Тип хромосом
1	P. e. (3n)	22,64 ± 1,87 (14,95–28,47)	18,28 ± 1,74 (11,89–24,83)	40,92 ± 3,55 (26,84–53,30)	15,26 ± 0,34 (14,12–16,24)	1,25 ± 0,04 (1,15–1,49)	44,57 ± 0,80 (40,11–46,58)	M
	P. e. (2n)	30,61 ± 1,96 (22,56–40,06)	24,83 ± 1,64 (15,59–31,80)	55,44 ± 3,41 (43,53–71,86)	15,41 ± 0,44 (13,88–18,50)	1,24 ± 0,07 (1,08–1,90)	44,77 ± 1,21 (34,54–48,18)	M
2	P. e. (3n)	21,90 ± 1,79 (14,40–26,74)	12,56 ± 1,00 (7,38–15,34)	34,46 ± 2,56 (21,77–42,08)	12,89 ± 0,28 (12,29–14,04)	1,76 ± 0,12 (1,44–2,14)	36,49 ± 1,51 (31,81–41,02)	SM
	P. e. (2n)	30,44 ± 1,83 (21,54–37,70)	17,02 ± 1,01 (12,52–21,72)	47,46 ± 2,44 (37,81–59,42)	13,21 ± 0,21 (12,36–13,84)	1,81 ± 0,12 (1,24–2,64)	35,93 ± 1,54 (27,45–44,66)	SM
3	P. e. (3n)	19,68 ± 1,64 (12,20–24,29)	11,43 ± 1,08 (6,85–14,52)	31,10 ± 2,57 (19,05–38,02)	11,60 ± 0,28 (10,90–12,86)	1,74 ± 0,10 (1,41–2,10)	36,68 ± 1,37 (32,29–41,54)	SM
	P. e. (2n)	25,78 ± 1,39 (19,98–30,08)	16,78 ± 1,31 (11,77–21,59)	42,57 ± 2,32 (33,86–50,50)	11,85 ± 0,26 (11,00–13,29)	1,97 ± 0,12 (1,29–2,12)	39,32 ± 1,73 (32,01–43,74)	SM
4	P. e. (3n)	17,39 ± 1,31 (10,97–20,94)	11,58 ± 1,22 (6,81–17,01)	28,97 ± 2,41 (17,78–37,20)	10,80 ± 0,16 (10,18–11,33)	1,53 ± 0,08 (1,19–1,73)	39,73 ± 1,31 (36,63–45,74)	SM
	P. e. (2n)	23,53 ± 1,56 (17,36–30,47)	14,82 ± 0,95 (9,74–18,07)	38,35 ± 2,24 (28,69–47,66)	10,67 ± 0,33 (8,56–12,22)	1,60 ± 0,10 (1,23–2,10)	38,70 ± 1,44 (32,25–44,86)	SM
5	P. e. (3n)	14,45 ± 1,20 (9,34–19,44)	10,82 ± 0,93 (6,32–13,77)	25,27 ± 2,11 (15,66–33,21)	9,43 ± 0,22 (8,93–10,42)	1,34 ± 0,03 (1,26–1,48)	37,26 ± 2,09 (40,34–44,27)	M
	P. e. (2n)	18,67 ± 1,03 (14,38–24,67)	14,50 ± 0,89 (10,72–19,13)	33,17 ± 1,77 (25,10–43,80)	9,24 ± 0,25 (7,50–10,07)	1,30 ± 0,06 (1,09–1,63)	43,69 ± 1,09 (37,97–47,90)	M
6	P. e. (3n)	9,61 ± 0,79 (5,98–11,98)	6,80 ± 0,60 (4,36–9,05)	16,40 ± 1,34 (10,34–21,03)	6,12 ± 0,10 (5,87–6,41)	1,42 ± 0,07 (1,29–1,75)	41,43 ± 1,08 (36,38–43,76)	M
	P. e. (2n)	12,43 ± 0,61 (10,13–14,64)	9,88 ± 0,52 (7,77–11,84)	22,31 ± 1,05 (18,42–26,44)	6,22 ± 0,16 (5,61–6,89)	1,26 ± 0,05 (1,07–1,55)	44,28 ± 0,95 (39,27–48,30)	M
7	P. e. (3n)	9,69 ± 0,84 (6,05–12,33)	5,76 ± 0,57 (3,41–7,48)	15,45 ± 3,16 (10,00–19,81)	5,76 ± 0,09 (5,32–6,03)	1,73 ± 0,20 (1,46–2,89)	37,26 ± 2,09 (25,69–40,73)	SM
	P. e. (2n)	12,60 ± 1,08 (8,82–18,99)	7,54 ± 0,78 (4,06–9,47)	20,14 ± 4,15 (15,56–24,92)	5,61 ± 0,11 (5,28–6,25)	1,82 ± 0,34 (1,18–3,20)	37,58 ± 3,71 (23,78–45,78)	SM
8	P. e. (3n)	11,03 ± 1,15 (6,69–14,27)	3,71 ± 0,27 (2,53–4,77)	14,74 ± 1,18 (9,97–18,42)	5,51 ± 0,12 (5,07–5,81)	3,05 ± 0,39 (1,65–4,55)	25,84 ± 2,73 (18,01–37,74)	ST
	P. e. (2n)	13,30 ± 1,04 (8,84–16,42)	5,86 ± 0,96 (3,39–10,35)	19,16 ± 0,93 (15,21–24,07)	5,34 ± 0,09 (4,72–5,69)	2,62 ± 0,50 (1,13–4,72)	30,54 ± 4,56 (17,48–46,89)	ST
9	P. e. (3n)	8,83 ± 0,63 (6,12–11,05)	4,95 ± 0,48 (3,35–6,40)	13,79 ± 1,08 (9,47–17,45)	5,15 ± 0,09 (4,69–5,42)	1,81 ± 0,08 (1,61–2,24)	35,76 ± 1,01 (30,85–38,38)	SM
	P. e. (2n)	11,54 ± 0,64 (8,71–13,54)	6,56 ± 0,56 (4,79–10,17)	18,10 ± 0,85 (14,85–21,40)	5,05 ± 0,11 (4,28–5,40)	1,81 ± 0,18 (1,10–2,80)	36,20 ± 2,21 (26,29–47,53)	SM
10	P. e. (3n)	9,14 ± 0,86 (6,25–12,47)	3,78 ± 0,25 (3,02–4,87)	12,92 ± 0,91 (9,46–16,23)	4,85 ± 0,16 (4,24–5,41)	2,46 ± 0,24 (1,44–3,32)	29,65 ± 2,35 (23,17–41,00)	ST
	P. e. (2n)	11,97 ± 0,57 (10,00–14,50)	5,66 ± 0,62 (3,60–8,90)	17,63 ± 0,76 (14,62–20,47)	4,92 ± 0,08 (4,51–5,24)	2,25 ± 0,28 (1,18–3,85)	31,88 ± 2,71 (20,64–45,97)	ST
11	P. e. (3n)	7,62 ± 0,52 (5,48–9,01)	4,44 ± 0,33 (2,72–5,12)	12,06 ± 0,77 (8,20–13,92)	4,53 ± 0,08 (4,21–4,74)	1,74 ± 0,11 (1,34–2,13)	36,76 ± 1,54 (31,97–42,69)	SM
	P. e. (2n)	10,77 ± 0,78 (7,77–13,91)	5,73 ± 0,57 (4,08–8,42)	16,50 ± 0,77 (12,43–18,98)	4,60 ± 0,10 (4,24–5,01)	1,99 ± 0,28 (1,22–3,32)	34,85 ± 3,12 (23,13–45,07)	SM
12	P. e. (3n)	7,26 ± 0,54 (4,70–8,62)	4,06 ± 0,34 (3,10–5,60)	11,32 ± 0,62 (8,18–12,71)	4,27 ± 0,13 (3,67–4,68)	1,84 ± 0,22 (1,27–2,78)	36,05 ± 2,59 (26,45–44,04)	SM
	P. e. (2n)	9,48 ± 0,58 (6,99–12,45)	5,69 ± 0,39 (4,14–7,63)	15,17 ± 0,70 (12,00–18,15)	4,23 ± 0,10 (3,80–4,77)	1,70 ± 0,16 (1,10–2,52)	37,56 ± 2,09 (28,40–47,66)	SM
13	P. e. (3n)	6,12 ± 0,36 (4,44–7,15)	3,96 ± 0,16 (3,56–4,60)	10,07 ± 0,46 (7,99–11,75)	3,82 ± 0,20 (3,12–4,57)	1,55 ± 0,08 (1,25–1,88)	39,41 ± 1,32 (34,76–44,49)	SM
	P. e. (2n)	7,82 ± 0,91 (6,58–10,75)	5,14 ± 0,62 (3,85–7,45)	12,96 ± 1,42 (11,44–16,94)	3,64 ± 0,40 (2,83–4,46)	1,48 ± 0,22 (1,18–2,79)	37,95 ± 4,28 (26,37–45,92)	SM
Общая длина карิโอгида	P. e. (3n)	267,48 ± 20,85 (174,72–328,28)						
	P. e. (2n)	358,97 ± 16,38 (293,39–434,85)						

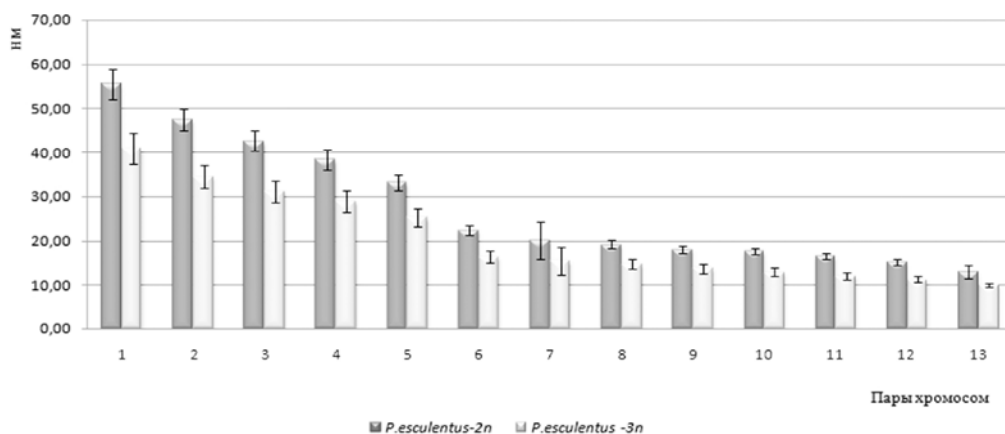
Следующие 24 мелкие хромосомы относятся к мета-, субмета-, и субтелоцентрическому типам. Шестая метацентрик, восьмая и десятая — субтелоцентрики, все остальные субметацентрики. Обычно на 9-й паре у зеленых лягушек присутствует вторичная перетяжка. Известно, что при тотальном окрашивании вторичные перетяжки могут быть не выявлены. Отметим, что у диплоидов такая перетяжка обнаруживается практически всегда (более 90 %) в отличие от триплоидных хромосомных наборов, где такая перетяжка прослеживается менее чем у 10 % просмотренных метафаз. Среди мелких хромосом часто теряются гомологи, около 40 %, что характерно и для диплоидов и триплоидов (рис. 1–3).



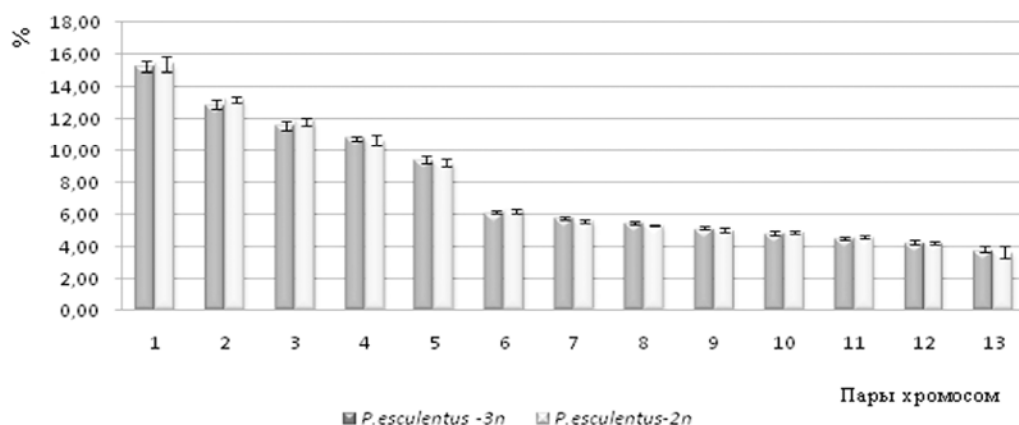
**Рис. 2.** Метафазные пластинки и кариогаммы диплоидной *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).  
**Fig. 2.** Metaphase plates and karyograms diploid of *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).



**Рис. 3.** Идиограмма триплоидных (3n) и диплоидных (2n) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).  
**Fig. 3.** Idiogram of 3n and 2n *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) of Ukraine.



**Рис. 4.** Абсолютная длина хромосом у триплоидных (3n) и диплоидных (2n) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).  
**Fig. 4.** Absolute length of chromosomes in 3n and 2n *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) of Ukraine.



**Рис. 5.** Относительная длина хромосом у триплоидных (3n) и диплоидных (2n) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).

**Fig. 5.** Relative length of chromosomes in 3n and 2n *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) in Ukraine.

Следует обратить внимание на размах изменчивости центромерного индекса (табл. 1), по которому, в большей степени, определяется тип хромосом. Значение данного показателя достаточно сильно варьирует на разных пластинках, следовательно, имеем разный тип гомологов на разных пластинках. Так, например, три гомолога 10 пары относительно субтелоцентричны, но на некоторых пластинках они могут быть субметацентриками, а по максимальному значению центромерного индекса некоторые имеют метацентрический тип (табл. 1), но в среднем значение центромерного индекса соответствует субтелоцентричности. На фоне морфологической идентичности, у триплоидного кариотипа один из гомологов, на разных пластинках может иметь отличную от других морфологию. В основном такая закономерность прослеживается в группе мелких хромосом.

По параметрам абсолютной длины каждая пара, и в целом все хромосомы в кариотипе, крупнее у диплоидов. Хромосомы триплоидов меньше по размерам (рис.4). Средняя общая длина триплоидного кариотипа составляет  $267,48 \pm 20,85$  нм, и, соответственно, больше размеры у диплоидов  $358,97 \pm 16,38$  нм. При сравнении параметров относительной длины, то здесь не наблюдается отчетливой закономерности. По данному показателю размеры практически не отличаются (рис. 5). Статистическое сравнение отличий относительной длины диплоидов и триплоидов не показало достоверных различий по этому показателю ( $p > 0,10$ ). При этом два хромосомных набора достоверно отличаются по центромерному и плечевому индексу 6-й ( $p < 0,005$ ) и 7-й пар хромосом ( $p < 0,025$ ).

Усредненные значения хромосомных показателей триплоидной *P. esculentus* позволили установить хромосомную формулу — 9 мета- (m) + 24 субмета- (sm) + 6 субтелоцентрика- (st),  $3n = 39$ , N. F. = 78 (табл. 1).

### Обсуждение

Известно, что триплоидные *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) встречаются во многих средне-, североευропейских популяциях. При этом доля триплоидов по отношению к числу гибридных особей в отдельных популяциях составляет 83 % (Günther, 1975; Plötner, 2005). Первые подтверждения триплоидности на кариологическом уровне были сделаны в начале 90-х гг. прошлого столетия (Hertwig & Hertwig 1920, Wickbom 1945 по: Plötner, 2005).

Полиплоидия, включая триплоидность, *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), на терри-

тории восточной Украины (Луганская, Донецкая, Харьковская области) была установлена сначала по размеру генома, с использованием метода проточной ДНК-цитометрии (Borkin et al., 2004; Боркин и др., 2005) и потом подтверждена на хромосомном уровне (Манило и др., 2007), к сожалению, без детального морфологического анализа. Здесь необходимо подчеркнуть, что процент полиплоидов по размеру генома составляет — 24 %, а триплоидов среди гибридов в среднем — 41 % в локальной выборке варьируя от 9 до 76 % (Боркин и др., 2005). По кариологическим данным триплоиды среди гибридов составляли около 10 % (Манило и др., 2007). В целом среди всех проанализированных нами особей *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) территории Украины (n = 245) доля триплоидов составила чуть больше 1 % (1,2 %). Можем утверждать, что опираясь на кариологические данные, в частности анализ метафазных пластинок, доля триплоидов гораздо меньше по сравнению с триплоидами определенными другими молекулярно-генетическими методами.

Что касается половозрастного состава среди обнаруженных нами триплоидов и тех, что описаны в литературе (Боркин и др., 2005; Манило и др., 2007), то какой-либо закономерности не прослеживается. Триплоидность характерна как для самок, так и для самцов. По размеру генома (Borkin et al., 2004) триплоиды описаны и среди ювенильных особей.

Триплоидные гибриды играют важную роль в поддержании популяционной структуры (Plötner, 2005). Известно, что способы наследования и принцип образования триплоидов прямо зависят от типа популяционной системы, т. е. с каким из родительских видов обитает гибридный таксон. На исследуемой нами территории *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) обитает с родительским видом *P. ridibundus* (Pallas, 1771). Это так называемая RE-система, которая отличается высокой структурной изменчивостью, разным соотношением полов (включая однополых гибридов) и присутствием триплоидных особей (Plötner, 2005). По нашим данным гибридогенный таксон в выборках представлен и самками, и самцами. В восточной Украине это достаточно распространенные популяционные системы (Borkin et al., 2004; Сурядная, 2005; Шабанов и др., 2006; Коршунов, 2008).

Говоря о возможных путях образования триплоидов, о структуре их генома, способах наследования, типах гамет, методом проточной ДНК-цитометрии установлено, что 54,8 % имеют геном LLR-типа (относительно меньший геном), 41,5 % с относительно большим геномом LRR-типа, и 3,7 % триплоидов имели промежуточные размеры генома (Боркин и др., 2005). Авторами высказано предположение, что триплоиды на данной территории образуются из нередуцированных диплоидных яйцеклеток гибридных самок. Позже было установлено, что *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) производит гаметы *P. lessonae* (Camerano, 1882) и *P. ridibundus* (Pallas, 1771) при отсутствии половозрелых *P. lessonae* (Camerano, 1882) *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) могут производить как отдельно L- и R-гаметы, так и одновременно с обоими геномами (Кечеджи и др., 2011). Описанный нами триплоидный кариотип характеризуется определенной неустойчивостью, о чем говорит размах изменчивости хромосомных показателей и, следовательно, разная типизация гомологов и самих триад на разных пластинках. Возможно, причиной такого результата и есть разнонаправленное образование триплоидов в данном регионе, включая своеобразный механизм удвоения генома при отсутствии одного из родительских видов, геном (L) которого содержит гибридогенный таксон и передает его в течение многих поколений.

Триплоидный кариотип *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), в целом, по типологии и хромосомным показателям совпадает с описанным нами ранее для диплоидов с территории Украины (Сурядная, 2003; Сурядная, 2005). При этом отличие проявляется в чуть большей субметацентричности хромосом. В работе наших коллег



(Манило и др., 2007) триплоидный кариотип имел больше метацентриков. Еще раз следует подчеркнуть, что использовать классификацию, если форма хромосом оценивается визуально без промеров, нужно достаточно осторожно, поскольку разные процессы, происходящие с хромосомами во время деления, могут дать недостоверный результат. В связи с этим хромосомная формула может отличаться у разных исследователей, что зависит от многих субъективных и других факторов, включая методику приготовления препаратов, принципы измерения хромосом, географическую изменчивость и пр.

В целом морфология отдельных хромосом не всегда одинакова, размеры гомологов варьируют, некоторые из них теряются, т.е. характерно наличие неполных наборов, все это говорит о своеобразной гетероморфности триплоидного кариотипа. Это явление можно объяснить, во-первых, достаточно сложными процессами, происходящими с хромосомами при делении клеток, особенно учитывая сложный механизм видообразования в данном комплексе животных, включая специфику образования триплоидов. Известно, что длина хромосомы закономерно изменяется на разных стадиях деления клетки, вследствие чего хромосомы имеют разную степень спирализации, хромосома укорачивается, может иметь разную длину. При этом плечи сокращаются неодинаково: укорочение более длинных происходит быстрее по сравнению с короткими. Дифференциальная конденсация может иметь место и между гомологичными хромосомами, обуславливая гетероморфизм гомологов. Все это значительно затрудняет определение как близких по размеру и форме, так и индивидуальную идентификацию хромосом.

Интересен факт присутствия неполных наборов, с потерей некоторых гомологов. Это явление встречается у диплоидов и триплоидов, как среди группы мелких, так и среди крупных хромосом. Здесь может идти речь как о сложных процессах митотического нерасхождения или утери хромосомы вследствие анафазного отставания. На данном этапе какой-либо четкой закономерности не прослеживается. Отметим, что наибольшее количество (74,3 %) аномальных наборов среди амфибий Украины характерно для *P. esculentus* (Сурядная, 2012).

Необходимо обсудить факт наличия/отсутствия вторичных перетяжек, которые у *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) встречаются на 9-й или 10-й, а также 3-й парах хромосом (Günther, 1970; Сурядная, 2005; Манило и др., 2007). Наше исследование показало достаточно низкую частоту проявления вторичных перетяжек у триплоидов при тотальном окрашивании. При этом в диплоидном хромосомном наборе перетяжки на 9-й паре почти всегда присутствуют на метафазных пластинках, что говорит об определенной стабильности диплоидного кариотипа. Известно, что вторичные перетяжки могут не окрашиваться стандартными красителями, а четко определяются только при дифференциальной окраске, при этом длина плеч хромосом, на которых потенциально может быть вторичная перетяжка, варьирует в зависимости от ее выраженности, что еще раз может говорить о специфичной гетероморфности хромосом триплоидного кариотипа.

Достоверные отличия по двум хромосомам триплоидного и диплоидного кариотипа могут говорить об особой эволюционной роли некоторых отдельных хромосом целостного генома в процессе видообразования зеленых лягушек.

## Выводы

В результате проведенных исследований были обнаружены новые точки находок трех триплоидных особей *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) на территории восточной Украины. Доля триплоидов в популяциях территории Украины составляет 1,2 %. Триплоидные *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) имеют симметричный кариотип, все хромосомы двуплечие, включает 15 крупных и 24 мелких хромосомы — 9 мета- (m) + 24 субмета- (sm) + 6 субтелоцентрика- (st),  $3n = 39$ , N. F. = 78. Группа круп-

ных хромосом представлены мета-, и субметацентрическими хромосомами, в группе мелких хромосом встречаются еще и субтелоцентрики. Хромосомы триплоидов меньше по размерам в сравнении с диплоидным кариотипом, при этом по относительной длине не наблюдается достоверных отличий, но сами кариотипы достоверно отличаются 6–7-й парами, что может говорить об особой эволюционной роли некоторых отдельных хромосом в целостном геноме. Установлена достаточно низкая частота (менее 10 %) проявления вторичных перетяжек у триплоидов на 9-ой паре хромосом, при этом в диплоидном хромосомном наборе перетяжки почти всегда присутствуют.

Описанный нами триплоидный кариотип характеризуется определенной неустойчивостью. На отдельных метафазных пластинках одинаковые типы хромосом или их гомологи варьируют по длине, некоторые теряются, а пределы изменчивости хромосомных параметров указывают на разную типизацию хромосом, в отличие от общего среднего значения, что говорит о своеобразной гетероморфности триплоидного кариотипа. Диплоидный кариотип более стабилен. Возможно, на эти процессы влияет разнонаправленное образование триплоидов и своеобразный механизм удвоения их генома. Возникает необходимость провести детальный сравнительный анализ кариотипов родительских видов с триплоидами, что даст возможность по морфологии определить, чьи хромосомы несет триплоид и как типы наследуемых геномов отражаются в кариотипе.

- Боркин Л. Я., Зиненко А. И., Коршунов А. В., Лада Г. А., Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Шабанов Д. А., 2005. Массовая полиплоидия в гибридогенном комплексе *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) на Востоке Украины. *Матеріали Першої конференції Українського Герпетологічного Товариства*. Ред. Є. Писанець. К.: Зоомузей ННПМ НАНУ: 23–26.
- Кечеджи А. Е., Михайлова О. В., Шабанов Д. А., 2011. Сперматогенез у триплоидних *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) из Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек (Украина, Харьковская область). *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*, Сер. біологія, вип. 14, № 971: 112–117.
- Коршунов А. В., 2008. Экологические особенности биотопического распределения представителей *Pelophylax esculentus complex* в Харьковской области. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*, Сер. біологія: 48–57.
- Макгрегор Г., Варли Дж., 1986. Методы работы с хромосомами животных. М.: Мир: 1–272.
- Манило В. В., Радченко В. И., Коршунов А. В., 2007. Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl. esculenta*) из Харьковской области Украины. Гол. ред. В. І. Ніколайчук. *Науковий вісник Ужгородського університету*, Сер. біологія, вип. 21, Ужгород: 68–73.
- Сурядная Н. М., 2005. Зелені жаби фауни України: морфологічна мінливість, каріологія та особливості біології. *Автореф... канд. біол. наук*. К.: 1–20 (рукопис).
- Сурядная Н. Н., 2003. Материалы по каріології зеленых лягушек (*Rana ridibunda* Pallas, 1771; *Rana lessonae* Camerano, 1882; *Rana esculenta* Linnaeus, 1758) с территории Украины. *Вестник зоологии*, К., 37, №1: 33–40.
- Сурядная Н. Н., 2010. Новые находки триплоидов *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) на востоке Украины. *Современная герпетология*, Саратов, 10, вып. 3/4: 128–131.
- Сурядная Н. Н., 2012. Хромосомные абберации амфибий, как оценочный индикатор стабильности развития. Под ред Н. Б. Ананьевой, Р. В. Новицкого и др. *Вопросы герпетологии: материалы пятого съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского, Минск, 24–27 сентября 2012 г.* ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам». Минск, ИООО «Право и экономика»: 305–309.
- Шабанов Д. А., Зиненко А. И., Коршунов А. В., Кравченко М. А., Мазепа Г. А., 2006. Изучение популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta complex*) в Харьковской области: история, современное состояние и перспективы. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна*, сер. біологія, вип. 3 (№729): 208–220.
- Borkin L. J., Korshunov A. V., Lada G. A., Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Shabanov D. A., Zinenko A. I., 2004. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta complex*) in Eastern Ukraine. *Russian Journal of Herpetology*,

- 11, N 3: 194–213.
- Günter R., 1970. Der Karyotyp von *Rana ridibunda* Pall. und das Vorkommen von Triploidae bei *Rana esculenta* L. (Anura, Amphibia). *Biol. Zbb*, **89**, H. 3: 327–342.
- Günter R., 1975. Zum natürlichen Vorkommen und zur Morphologie triploider Teichfrosche, "*Rana esculenta*", L. in der DDR (Anura, Ranidae). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum Berlin*, **51**: 145–158.
- Hoffmann, A., Plötner J., Pruvost N., Christiansen D. G., Röthlisberger S., Choleva L., Mikulicek P., Cogalniceanu D., Sas-Kovacs I., Shabanov D., Morozov-Leonov S., Reyer H-U., 2015. Genetic diversity and distribution patterns of diploid and polyploid hybrid water frog populations (*Pelophylax esculentus* complex) across Europe. *Molecular Ecology*, **24**: 4371–4391.
- Lewan A., Fredga K., Sandberg A. A., 1984. Nomenclature for centrometric position on chromosomes. *Hereditas*, **52**: 201–220.
- Litvinchuk S. N., Skorinov D. V., Rosanov J. M., 2015. Natural spontaneous autotriploidy in the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae). *Russian Journal of Herpetology*, **22**, N. 4: 318–320.
- Plötner J., 2005. Die westpalaarktischen Wasserfrosche. Bielefeld: Laurenti-Verlag: 1–161.
- Suryadnaya N. N., 2014. Comparative analysis of karyotypes of two cryptic species of pelobatid frogs (Amphibia, Anura) of Ukraine. *Vestnik zoologii*, **48**(6): 511–520.

H. M. Сурядна

МОРФОЛОГІЯ ХРОМОСОМ ТРИПЛОЇДНИХ *PELOPHYLAX ESCULENTUS* (ANURA, RANIDAE) УКРАЇНИ.

У результаті проведених досліджень нами були виявлені нові знахідки трьох триплоїдних особин *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) на території східної України. Частка триплоїдів в популяціях складає 1,2 %. Триплоїдні *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) мають симетричний каріотип, всі хромосоми двоплечі, включають 15 крупних і 24 дрібних хромосом — 9 мета- (m) + 24 субмета- (sm) + 6 субтелоцентрика (st),  $3n = 39$ ,  $NF = 78$ . Диплоїдний та триплоїдний каріотип *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) достовірно відрізняється 6–7-ю парами, що може говорити про особливу еволюційну роль окремих хромосом. За параметрами відносної довжини достовірних відмін не виявлено. Маємо досить низьку частоту (менше 10 %), прояву вторинних перетяжок у триплоїдів. Триплоїдний каріотип характеризується певною нестабільністю. Диплоїдний каріотип більш стійкий. На окремих метафазних пластинках однакові типи хромосом або їх гомологи варіюють по довжині, наявні неповні набори, а межі міліновості хромосомних параметрів вказують на різну типізацію хромосом, на відміну від узагальненого середнього значення, що говорить про своєрідну гетероморфність триплоїдного каріотипу.

К л ю ч о в і с л о в а: хромосоми, каріотип, триплоїд, диплоїд, *Pelophylax esculentus*, Україна.

N. N. Suriadnaia

THE MORPHOLOGY OF THE CHROMOSOMES OF TRIPLOID *PELOPHYLAX ESCULENTUS* (ANURA, RANIDAE) OF UKRAINE.

The study, we described new records of three triploid individual of *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) in eastern Ukraine. A percentage of triploids in populations on the territory of Ukraine is 1,2 %. Triploids of *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) have symmetrical karyotype, all chromosomes two-armed and include 15 large and 24 small chromosomes: 9 metha- (m) + 24 submetha- (sm) + 6 subtelo-centrics- (st),  $3n = 39$ ,  $N. F. = 78$ . Based on relative length, significant differences between  $2n$  and  $3n$  *P. esculentus* (Linnaeus, 1758) are not revealed, but 6–7th pairs differ significantly. We have found low frequency (less 10 %) of occurrence of secondary constrictions in triploids. Triploid karyotype is characterized by certain instability. Diploid karyotype is more stable. In some metaphase plates of the same type of chromosomes or their homologues vary in length. Homologues can be losted and chromosomal variability of parameters influence on typing of chromosomes, in contrast of mean values, which indicates of the kind of heteromorphic triploid karyotype.

К е у w o r d s: karyotype, triploids, diploids, *Pelophylax esculentus*, Ukraine.