

С.Ю. МОРОЗОВ-ЛЕОНОВ,
Е.И. ЖАЛАЙ, С.В. МЕЖЖЕРИН

Институт зоологии им. И.И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев
e-mail: morleone2000@yahoo.com

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АСИММЕТРИЧНОСТЬ ГИБРИДНЫХ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК КОМПЛЕКСА *RANA ESCULENTA* (AMPHIBIA : RANIDAE) УКРАИНЫ



Путем исследования экспрессии аллелей видоспецифичных генов в половых клетках гибридов установлено существование на территории Украины трех локальных сообществ, у гибридов которых отторгается либо геном озерной лягушки (низовья Дуная), либо тот или другой геном (бассейн р. Северский Донец), либо геном прудовой лягушки (оставшаяся зона ареала). Исследование отторжения кожных графтов родительских видов у гибридов показало, что независимо от того, какова направленность элиминации генома у гибридов в данной популяции, всегда раньше распознается и соответственно начинает отторгаться графт озерной лягушки. Таким образом, генетическая асимметричность гибридов проявляется и на тканевом уровне, и по своей направленности она соответствует ее проявлению на организменном уровне.

© С.Ю. МОРОЗОВ-ЛЕОНОВ, Е.И. ЖАЛАЙ,
С.В. МЕЖЖЕРИН, 2006

Введение. Главной особенностью гибридогенного комплекса зеленых лягушек, образованного двумя широко распространенными видами прудовой *Rana esculenta* (= *lessonae*) и озерной *R. ridibunda* лягушек, является уникальная для наземных позвоночных аллодиплоидная структура гибрида *R. esculenta* — *ridibunda*. Определенная экологическая автономность по отношению к родительским видам, а также образование гамет, связанное с так называемым полуклональным размножением, в основе которого лежит премейотическая элиминация одного из родительских геномов [1], и явились основанием для того, чтобы эту гибридную форму рассматривать в качестве особой таксономической категории — «клептона», которому, как и биологическим видам, дают биномиальное название *Rana* kl. *esculenta* [2].

Известно, что генетическая асимметричность гибридов у аллодиплоидных зеленых лягушек проявляется на клеточном и организменном уровнях в виде направленной премейотической элиминации геномов и доминирования особенностей биологии и морфологических признаков одного из родительских видов, причем на большей части ареала у гибридных особей происходит элиминация генома только прудовой лягушки [3]. Однако в ряде местностей имеет место обратная ситуация — элиминируется геном озерной лягушки. Бывают случаи, когда в процессе гаметогенеза у одной и той же особи из гаметогенеза исключаются в одних клетках хромосомные наборы прудовой, а в других — озерной лягушек, т.е. генетическая асимметричность гибридов, но только на уровне отдельных клеток, всегда сохраняется.

Аллодиплоиды, будучи формально генетически строго промежуточными по отношению к родительским видам, проявляют свою асимметричность не только при элиминации генома одного из родительских видов, но и в своей морфологии и экологии [4]. Так, например, гибриды популяций Среднего Приднепровья по экстерьерным признакам и биологическим особенностям [5, 6] больше похожи на прудовых, чем на озерных лягушек. Генетическая асимметричность гибридов, связанная с доминированием генов одного вида над другим, известна и у других гибридизирующих амфибий [7]. Если исходить из того, что асимметричность гибридов *R. esculenta* — *ridibunda*

проявляется на клеточном и организменном уровнях, причем она временами имеет противоположную направленность, то возникает вопрос о характере генетической асимметрии на тканевом уровне. В этой связи особый интерес представляет метод тканевых пересадок, в частности кожных графтов, который широко применяется при исследованиях структуры гибридогенных комплексов позвоночных [8—11] и был апробирован в том числе для зеленых лягушек *R. esculenta* complex [12]. Такое широкое распространение и актуальность исследований с применением этого метода связаны с возможностью анализа гипервариабельной части генома технически простым приемом.

Особый интерес представляют генетические исследования зеленых лягушек с территории Украины, структура популяций которых изучена весьма подробно [3, 13]. Это позволило провести своего рода геногеографическое районирование и вычленить регионы, в популяциях которых обитают гибриды со своими особенностями: неоднозначной половой структурой, разной плоидностью и строгостью премейотической элиминации [14]. В этой связи было бы интересно исследовать характер гибридизационных процессов по ареалу и подтвердить разноразнообразие гибридов еще и с помощью других подходов, в частности методом трансплантации тканей.

Материалы и методы. *Определение генотипов гамет.* Традиционно направленность элиминации генома того или иного родительского вида определяли путем скрещивания гибридов с одним из родительских видов с дальнейшим анализом либо морфологии, либо генотипов потомков [15]. То же можно определить и с помощью ДНК-цитометрии, поскольку известно, что содержание ДНК в ядрах этих видов имеет четкие межвидовые различия [16]. В настоящей работе использован иной метод — анализ электрофоретических спектров половых клеток. Для этого получали суспензии мужских гамет или гомогенаты индивидуальных икринок, которые затем подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле [17] с последующим гистохимическим окрашиванием продуктов локуса *Ldh-B*, дающего самое высокое разрешение.

Гомогенаты отдельных икринок готовили следующим образом. Животных анестезировали этиловым эфиром 3-аминобензойной кислоты. После этого брали яичники со зрелой икрой. Отдельные икринки извлекали препаровальной иглой под бинокляром и сразу же помещали на фильтровальную бумагу на 10—20 с, что позволяло очистить их от межтканевой жидкости. После этого икринки индивидуально раскладывали в пробирки. В каждую пробирку добавляли 2—3 капли 10%-ного раствора сахарозы, подкрашенного бромфеноловым синим. В закрытом виде пробу промораживали в течение 12 ч. После этого каждую икринку раздавливали в пробирке и встряхивали пробирку до полного перемешивания содержимого икринки с раствором сахарозы.

Для получения суспензии мужских половых клеток семенники извлекали из полости тела, промывали в дистиллированной воде, подсушивали на фильтровальной бумаге и раздавливали между двумя предметными стеклами, после чего смывали 2 мл дистиллированной воды в фильтровальную воронку. Для фильтрации использовали крупнопористую бумагу. Полученный фильтрат, который обязательно должен быть мутным (это является контролем успешности приготовления пробы), центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Затем надосадочную жидкость шприцем переносили в пробирку и центрифугировали 15 мин при 5000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости добавляли 2—3 капли 10%-ного раствора сахарозы, подкрашенного бромфеноловым синим, после чего в закрытом виде промораживали в течение 12 ч. После размораживания пробирку встряхивали до получения однородной мутной суспензии.

Трансплантация и анализ отторжения. Исследование проведено на лягушках, отловленных в 2003—2005 гг. из природных популяций не только разного типа, но и различных регионов Украины. Видовая принадлежность и генетическая структура особей были первоначально определены по морфологическим признакам, а после трансплантационных тестов подтверждены путем анализа генных маркеров. Основу анализа составили гибриды из популяций следующих типов и регионов: RE-типа — озерная лягушка (R) + гибридная фор-

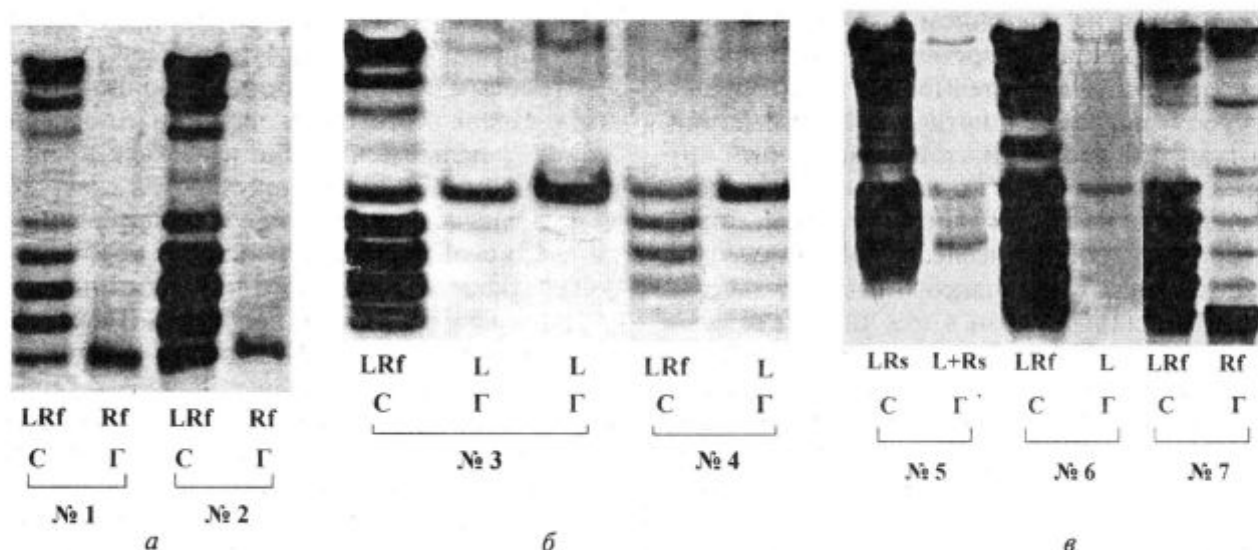


Рис. 1. Электрофоретический спектр лактатдегидрогеназы соматических (С) и генеративных (Г) тканей гибридных особей: а — лягушки Новобеличей (№ 1), Барышевки (№ 2). LRF — экспрессия гибридного генотипа, Rf — аллеля озерной лягушки; б — лягушки Вилково (№ 3, 4). LRF — экспрессия гибридного генотипа, L — аллеля прудовой лягушки; в — лягушки Гайдар (№ 5–7). L + Rs — одновременная экспрессия аллелей прудовой и озерной лягушек, L — аллеля прудовой, Rf — озерной

ма (Е) (окр. с. Гайдара, Змиевский р-н Харьковской обл., 27 экз.; г. Вилково Одесской обл., 15 экз.; окр. г. Ужгород Закарпатской обл., 9 экз.); LE-типа — прудовая лягушка (L) + гибридная форма (E) (окр. г. Нежин Черниговской обл., 8 экз.; пгт Барышевка Киевской обл., 20 экз.), LER-типа — прудовая лягушка (L) + гибридная форма (E) + озерная лягушка (R) (окр. жилмассива Новобеличи г. Киева, 20 экз.).

В основу исследования положен классический метод пересадки кожных графтов (skin grafting) от родительских видов гибридам [18], модифицированный для взрослых лягушек [19, 20].

Исследования по трансплантации проводили в летний период с июня по август. Пойманных сразу после нереста лягушек содержали в аквариумах с отстоянной водопроводной водой при 20 ± 3 °С. Кормили лягушек сырой говяжьей печенью два раза в неделю. Эксперимент начинали только после адаптации лягушек к лабораторным условиям содержания. У каждой гибридной особи, анестезированной этиловым эфиром 3-аминобензойной кислоты, снимали с правой и левой стороны спины участки кожи (около 9 мм²), на место которых трансплантировали донорские графты от одного и второго

родительского вида соответственно. Для пересадок старались брать особей из одной и той же популяции, хотя в ряде случаев, если в данной местности один из родительских видов

Таблица 1

Генотипы гамет, производимых гибридными зелеными лягушками Украины

Выборка	Тип популяции	Пол	Генотип гамет			n
			L	R	L+R	
Новобеличи	LER	♀	0	0	0	0
		♂	0	12	0	12
Барышевка	LE	♀	0	2	0	2
		♂	0	6	0	6
Нежин	LE	♀	0	0	0	0
		♂	0	5	0	5
Вилково	RE	♀	4	0	0	4
		♂	6	0	0	6
Гайдара	RE	♀	0	0	0	0
		♂	4	2	3	9
Ужгород	RE	♀	0	18	0	18
		♂	0	0	0	0

Примечание. n — число исследованных животных.

отсутствовал, доноров подбирали из других мест. По окончании анализа динамики отторжения графтов животных забивали для электрофоретического анализа соматических и генеративных тканей.

Статистическая обработка результатов. Для сравнения средних использовался ϕ -критерий Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение.
Наследование родительских геномов. Числа исследованных особей по каждому региону и конкретным популяционным системам представлены в табл. 1. В экстрактах половых клеток гибридных лягушек из водоемов окрестностей Новобеличей, Барышевки, Нежина и Ужгорода наблюдали явное количественное преобладание продуктов аллелей озерной лягушки по гену *Ldh-B* (рис. 1, а). Наличие минорных гибридных спектров на электрофореграмме экстрактов семенников может свидетельствовать о присутствии в экстрактах либо незначительной примеси клеток соматических тканей, либо недостаточно отмытой межтканевой жидкости. У гибридов из ериков г. Вилково однозначно проявлялись аллели прудовой (рис. 1, б), а у гибридов из Гайдар встречались как особи, производящие гаметы одного типа (с экспрессией генов только озерной или прудовой лягушек), так и особи, производящие смесь гамет двух типов (рис. 1, в). Таким образом, на территории Украины обнаружены все

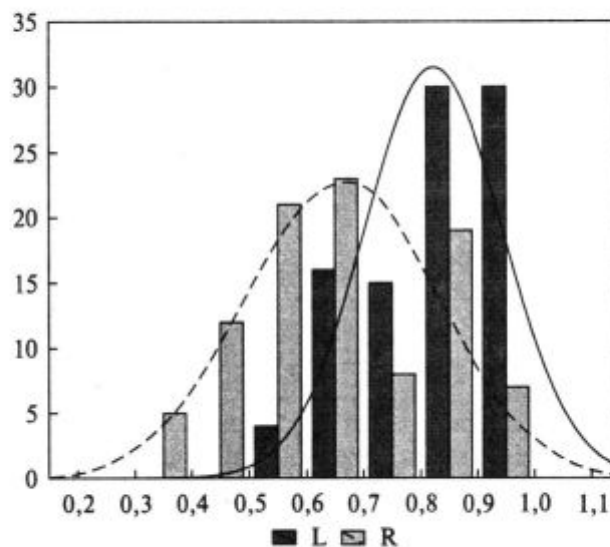


Рис. 2. Длительность латентной фазы (по горизонтали), выраженная в процентах от максимальной, у гибрида на трансплантаты озерной (R) и прудовой (L) лягушек; по вертикали — количество графтов

ранее известные для данной гибридной формы типы наследования родительских геномов: прудовой лягушки, озерной и параллельно обоих видов. Необходимо подчеркнуть, что каждый из типов наследования четко приурочен к тому или иному бассейну, но при этом не связан с типом популяции, что доказывает географическую разнокачественность гибридов. Так, строгая элиминация генома прудовой ля-

Таблица 2

Относительная скорость ответа озерной (R) и прудовой (L) лягушек у гибридов разных популяций от последнего начала отторжения графта в конкретной серии, %

Выборка	Тип графта	Количество графтов	M, %	m	F	P
Новобеличи (LER)	R	18	69	1,22	9,07	<0,01
	L	18	87	0,35		
Барышевка (LE)	R*	19	69	0,93	0,22	>0,05
	L*	20	73	0,33		
Нежин (LE)	R*	9	64	0,79	8,70	<0,01
	L	9	85	0,75		
Гайдары (RE)	R	26	62	0,26	21,59	<0,001
	L*	26	77	0,27		
Вилково (RE)	R	15	72	0,16	16,93	<0,001
	L*	15	84	0,16		
Ужгород (RE)	R	8	51	0,40	46,51	<0,001
	L*	8	86	0,35		

* Графты взяты от особей из других популяций.

гушки происходит в популяциях трех типов (табл. 1): LER (Новобеличи), где наряду с гибридами встречаются два родительских вида; LE (Барышевка, Нежин), в которых совместно обитают гибриды и прудовые лягушки; RE (Ужгород) — популяции озерных лягушек с гибридами. Гибриды в перечисленных популяциях имеют разное происхождение и возможно в какой-то степени и генетическую природу.

Характер отторжения трансплантатов. Во всех выборках, за исключением лягушек из Барышевки, где продолжительность латентной фазы для разных типов графтов была статистически недостоверной, гибриды отторгли трансплантаты вначале озерных лягушек, а затем прудовых (табл. 2), причем во всех этих выборках различия были высоко достоверными. Нормирование скорости прохождения реакции позволило получить среднее значение латентной фазы для всех выборок в целом, т.е. оценить общую тенденцию (рис. 2). В результате оказалось, что средняя продолжительность латентной фазы на трансплантат кожи озерной лягушки составила $64,5 \pm 3,1$ % от максимальной ее продолжительности, тогда как начало отторжения графта прудовой лягушки происходит гораздо позже ($82,0 \pm 2,3$ %; $F = 20,62$; $p < 0,001$).

Таким образом, во всех географических регионах (плавни Дуная, равнинное Закарпатье, Среднее Приднепровье, Северский Донец) однозначно быстрее отторгаются графты озерных лягушек по сравнению с трансплантатами прудовых. При этом не имело значения, были ли виды-доноры взяты из одной местности с гибридами, или отсутствующий в данной популяции родительский вид брался из другой местности. Географическая локализация популяции, от которой зависит характер наследования родительских геномов, не влияет на скорость распознавания иммунной системой гибрида графтов родительских видов.

Выводы. Электрофоретический анализ видоспецифичных спектров аллозимов половых клеток показал, что у гибридов зеленых лягушек на территории Украины представлены все известные типы наследования родительских геномов. Различные типы имеют четкую географическую привязанность к определенным популяциям. Проведенное исследование по

пересадке кожи родительских видов на гибридных лягушек показало, что вне зависимости от местонахождения популяции и типа наследования у гибридной формы в большинстве выборок происходит более раннее отторжение графтов озерной лягушки, чем прудовой. Очевидно, это большее сродство гибридной формы с прудовой лягушкой никак не коррелирует с направленностью элиминации родительских геномов у гибридной формы, но совпадает с доминированием морфологических и экологических признаков прудовой лягушки над озерной у гибридной формы. Таким образом, не только на клеточном и организменном, но и на тканевом уровне в комплексе зеленых лягушек имеет место генетическая асимметричность гибридов.

Авторы выражают искреннюю признательность коллегам Д.А. Шабанову и А.В. Коршунову (Харьков), Ф.Ф. Куртяку (Ужгород), А.С. Матвееву (Вилково) за неоценимую помощь в сборе материала.

SUMMARY. Research of the alleles of the species-specific genes in the gametal cells of *Rana kl. esculenta* hybrids proved the existence of three local populations within the territory of Ukraine. Their hybrids reject either the genome of lake frog (Danube lowland), either the previous one or another one genome (basin of Severskiy Donets river), either the genome of pond frog (the residuary territory of the areal). The research of skin transplants rejection of hybrids' parental species has shown that despite the orientation of genome elimination of this population the graft of lake frog always starts identifying and rejecting earlier. That is why the genetic skewness of hybrids becomes apparent at the skin level and corresponds to its manifestations at the organism level.

РЕЗЮМЕ. Шляхом вивчення експресії алелів видоспецифічних генів у статевих клітинах гібридів *Rana kl. esculenta* було встановлено існування на території України трьох локальних угруповань, у гібридів яких елімінується або геном озерної жаби (понижзя Дунаю), або той чи інший геном (басейн р. Сіверський Донець), або геном ставкової жаби (решта ареалу). Дослідження відторгнення шкірних трансплантатів батьківських видів у гібридів показало, що незалежно від направленості елімінації геному у гібридів в даній популяції завжди раніше розпізнається і відповідно починає відторгатися графт озерної жаби. Таким чином, генетична асиметричність гібридів проявляється і на тканинному рівні, і за своїм напрямом вона відповідає її прояву на рівні організму.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградов А.Е., Розанов Ю.М., Цауне И.А., Боркин Л.Я. Элиминация генома одного из родителей до премейотического синтеза ДНК у гибридогенного вида *Rana esculenta* // Цитология. — 1988. — 30, № 6. — С. 691—697.
2. Günther R. Europäische Wasserfrösche (Anura, Ranidae) und biologisches Artkonzept // Mitt. Zool. Mus. Berl. — 1991. — 67, № 1. — P. 39—53.
3. Морозов-Леонов С.Ю. Генетические процессы в гибридных популяциях зеленых лягушек *Rana esculenta* complex Украины : Автореф. дис... канд. биол. наук. — К., 1998. — 24 с.
4. Бергер Л. Является ли прудовая лягушка *Rana esculenta* complex обыкновенным гибридом? // Экология. — 1976. — № 2. — С. 37—43.
5. Некрасова О. Д. Межвидовая изменчивость и полиморфизм окраски зеленых лягушек *Rana esculenta* complex (Amphibia, Ranidae) гибридных популяций // Вестн. зоологии. — 2002. — 36, № 4. — С. 47—54.
6. Некрасова О. Д., Межжерин С. В., Морозов-Леонов С.Ю. Демографическая структура гибридных популяций *Rana esculenta* complex (Amphibia, Ranidae) Среднего Приднепровья // Вестн. зоологии. — 2004. — 38, № 6. — С. 47—56.
7. Янчуков А.В., Морозов-Леонов С.Ю. Сравнительный анализ генетического состава гибридных популяций европейских жерлянок рода *Bombina* (Окен, 1816) из Украины и Хорватии // Цитология и генетика. — 2002. — 36, № 3. — С. 36—40.
8. Maslin T.P. Skin grafting in the bisexual teiid lizard *Cnemidophorus sexlineatus* and in the unisexual *C. tessellatus* // J. Exp. Zool. — 1967. — 166, № 1. — P. 137—150.
9. Dawley R.M., Yeakel A.M., Beaulieu K.A., Phiel K.L. Histocompatibility analysis of clonal diversity in unisexual hybrids of the killifishes *Fundulus heteroclitus* and *Fundulus diaphanus* // Can. J. Zool. — 2000. — 78. — P. 923—930.
10. Abuhteba R.M., Walker J.M., Cordes J.E. Genetic homogeneity based on skin histocompatibility and the evolution and systematics of parthenogenetic *Cnemidophorus laredoensis* (Sauria: Teiidae) // Can. J. Zool. — 2000. — 78. — P. 895—904.
11. Taylor H.L., Walker J.M., Cordes J.E., Manning G.J. Application of the evolutionary species concept to parthenogenetic entities: comparison of postformational divergence in two clones of *Asspodoscelis tessellata* and between *Asspodoscelis cozumela* and *Asspodoscelis maslini* (Squamata: Teiidae) // J. Herpetol. — 2005. — 39, № 2. — P. 266—277.
12. Semik D. Comparison of reactions to skin grafts in green frogs: *Rana lessonae* Cam., *R. esculenta* L. and *R. ridibunda* Pall. // Arch. immunol. therap. exp. — 1983. — № 31. — P. 429—436.
13. Некрасова О.Д. Структура популяций зеленых жаб *Rana esculenta* complex урбанизованных территорий Среднего Придніпров'я : Автореф. дис... канд. биол. наук. — К., 2002. — 19 с.
14. Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю., Некрасова О.Д., Куртяк Ф.Ф., Жалай Е.И. Пространственная структура гибридного комплекса зеленых лягушек *Rana esculenta* L. на территории Украины // Матеріали Першої конференції Українського герпетологічного товариства. — Київ, 2005. — С. 110—114.
15. Günther R., Uzzell T., Berger L. Inheritance patterns in triploid *Rana «esculenta»* // Mitt. Zool. Mus. Berlin. — 1979. — 55, № 1. — P. 35—57.
16. Mazin A.L., Borkin L.Ja. Nuclear DNA content in green frogs of the genus *Rana* // Mitt. Zool. Mus. Berlin. — 1979. — 55, № 1. — P. 217—224.
17. Межжерин С.В., Песков В.Н. Биохимическая изменчивость и генетическая дифференциация популяций озерной лягушки *Rana ridibunda* Pall. // Цитология и генетика. — 1992. — 26, № 1. — С. 43—48.
18. Hildemann W. H., Haas R. Homotransplantation immunity and tolerance in the bullfrog // J. Immunol. — 1959. — 83, № 5. — P. 478—485.
19. Plytycz B., Semik D. Rejection of skin allo- and xenografts in the grass frog, *Rana temporaria* and the edible frog, *Rana esculenta* // Arch. immunol. therap. exp. — 1980. — № 28. — P. 625—634.
20. Козиненко И.И., Жалай Е.И., Заводникова Н.С. Особенности аллотрансплантации в гибридном комплексе *Rana esculenta* (Amphibia, Ranidae) // Вестн. зоологии. — 2006. — 40, № 1. — С. 49—53.

Поступила 16.02.06