

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ КОМПЛЕКСА СРЕДНЕЕВРОПЕЙСКИХ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК *Pelophylax esculentus*

© 2017 г. Д. В. Дедух, А. В. Красикова*

Санкт-Петербургский государственный университет,
кафедра цитологии и гистологии, Санкт-Петербург 199034

*e-mail: alla.krasikova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.09.2016 г.

Комплекс среднеевропейских зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus*) представляет уникальную и адекватную модельную систему для изучения межвидовой гибридизации, а также для анализа механизмов, связанных с преодолением репродуктивных барьеров межвидовыми гибридами. Сложность в изучении представителей комплекса *P. esculentus* связана с высоким полиморфизмом морфологических признаков у родительских видов и межвидовых гибридов, а также наличием полиплоидных форм гибридов. С момента открытия феномена межвидовой гибридизации и доказательства успешного воспроизводства межвидовых гибридов исследователи постоянно осуществляли поиск методов, необходимых для наиболее точной идентификации родительских видов и различных форм гибридов. В настоящем обзоре приведено описание биохимических, цитогенетических и молекулярных методов и подходов, применяемых для идентификации представителей комплекса зеленых лягушек, а также для анализа геномов, передаваемых с гаметами гибридов; обсуждаются преимущества и недостатки этих подходов. Представленные методы могут быть использованы для изучения других гибридных комплексов рыб, амфибий и рептилий.

Ключевые слова: геномная гибридизация *in situ*, зеленые лягушки, межвидовая гибридизация, полиплоидные формы, сравнительная геномная гибридизация, флуоресцентная гибридизация *in situ*.

DOI: 10.7868/S0016675817080045

Комплекс среднеевропейских зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus*) представляет собой удобную модель для изучения ранних стадий видообразования посредством межвидовой гибридизации, полуклонального размножения и процессов, связанных с возникновением и воспроизводством полиплоидных гибридов. Этот комплекс включает два родительских вида — *P. ridibundus* (геномная композиция RR) и *P. lessonae* (геномная композиция LL), а также гибридную форму *P. esculentus* (геномная композиция RL), которая образуется в результате скрещивания родительских видов [1, 2]. Геном соматических клеток диплоидных гибридных лягушек состоит из гаплоидных геномов двух родительских видов и составлен 13 хромосомами *P. ridibundus* и 13 хромосомами *P. lessonae* [3, 4]. Как правило, у диплоидных гибридов в клетках зародышевой линии один из двух геномов элиминируется, после чего оставшийся геном эндореплицируется, что приводит к восстановлению диплоидного набора. В результате возможно прохождение нормального мейотического деления, что необходимо для формирования гамет [2, 5, 6]. Такой способ вос-

производства межвидовых гибридов зеленых лягушек, который характеризуется клональной передачей в гаметы только одного родительского генома, получил название гибридогенез, или полуклональное воспроизводство [2, 7].

Гибридные лягушки распространены практически повсеместно на территории Европы, что может свидетельствовать об их эволюционном успехе [8, 9]. Несмотря на отличия в образе жизни, родительские формы и гибриды часто живут совместно и во время нереста могут образовывать общие группы размножения, где происходит не только воспроизводство каждой из форм, но и их гибридизация. При этом гибридные лягушки могут обитать с одним из родительских видов, с обоими родительскими видами, а также без родительских видов [8–10]. Считается, что удаление генома одного из родительских видов происходит не случайно, а определяется тем родительским видом, с которым обитает гибридная форма. Обитая с *P. lessonae*, гибриды обычно формируют гаметы с геномом R, тогда как обитая с *P. ridibundus* — гаметы с геномом L [8–11]. Особый интерес представляет наличие в естественных экосистемах

триплоидных (RRL и RLL, $3n = 39$) и даже тетраплоидных форм гибридов (RRL, $4n = 48$) [8, 9, 12–14]. Считается, что в гаметогенезе триплоидных гибридов происходит элиминация того генома, который представлен одной копией в геноме триплоидных гибридов, в то время как два других генома могут осуществлять рекомбинацию [5, 11–14]. Таким образом, триплоидные гибриды предположительно способны заменять особей родительского вида и участвовать в формировании популяционных систем, включающих только гибридных особей различной пloidности [11–14]. Такие популяционные системы встречаются даже за пределами ареалов обоих родительских видов [12–14]. Разнообразие ди- и полиплоидных форм гибридов позволяет наблюдать постепенный переход от полуклональной диплоидной гибридной формы, которая зависит от родительских видов, до независимой, размножающейся половым путем эволюционной единицы [8, 9, 12–14]. Существует предположение, что триплоиды также могут служить мостиком для формирования тетраплоидных животных, которые, в случае успешного воспроизводства, могут сформировать новый вид [15, 16].

Гибридная природа *P. esculentus*, а также присутствие в популяционных системах не только диплоидных, но и триплоидных форм делает невозможным достоверную идентификацию всех форм гибридов по стандартным морфологическим, акустическим и морфометрическим признакам [9, 17, 18]. В ходе детального анализа зеленых лягушек из популяционных систем в Польше были использованы три главных морфометрических индекса, основанных на длине первого пальца ноги (*digitus primus*, DP), пяточного бугра (*callus internus*, CI), голени (*tibia*, T) и длины бедра (*femur*, F), названные DP/CI, T/CI и F/T. Эти индексы позволяют надежно идентифицировать 91% диплоидных лягушек, но только 84% триплоидных лягушек с генотипом LLR и 52% триплоидных лягушек с генотипом RRL [19]. Однако главной сложностью в идентификации представителей этого комплекса является существенное различие морфологических признаков даже у особей с одинаковым генотипом, но из разных популяций [17, 20]. Поэтому для достоверной идентификации всех представителей комплекса зеленых лягушек необходимо использование более точных цитогенетических и молекулярных методов исследования. Помимо идентификации родительских видов и гибридных форм, ключевой задачей можно считать изучение гаметогенеза и определение геномов, передаваемых с гаметами гибридных самок и самцов. Точная иденти-

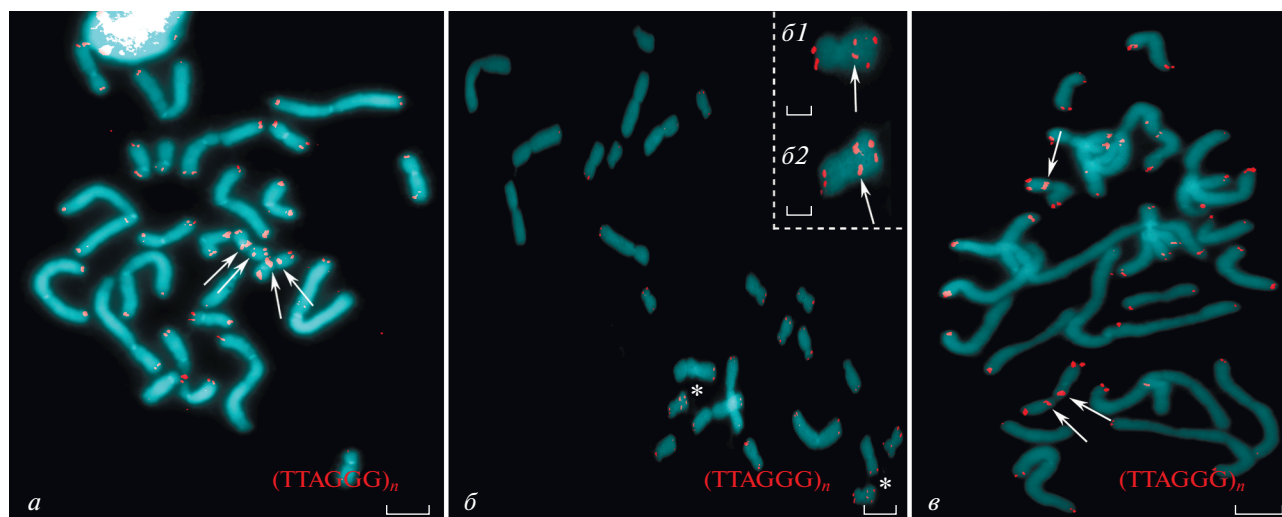
фикация передаваемых с гаметами геномов необходима для понимания механизмов возникновения и поддержания ди- и триплоидных гибридных животных в популяционных системах комплекса *P. esculentus*.

Для исследования гибридного комплекса зеленых лягушек в настоящее время используют следующие классические и современные методы:

- аллозимный анализ;
- определение размера генома эритроцитов;
- кариотипирование с последующим С-бэндингом хромосом;
- кариотипирование с последующим флуоресцентным бэндингом;
- кариотипирование с последующей флуоресцентной гибридизацией *in situ*;
- кариотипирование с последующей геномной гибридизацией *in situ*;
- микросателлитный анализ;
- рестрикционный анализ;
- проточная ДНК-цитометрия;
- характеристика набора хромосом типа ламповых щеток из растущих ооцитов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ АЛЛОЗИМНОГО АНАЛИЗА

Одним из первых наиболее эффективных подходов для исследования представителей комплекса зеленых лягушек можно считать определение аллозимов с помощью электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле [2, 5]. Этот метод основан на различии аллелей генов, кодирующих определенные ферменты (аллозимы) у родительских видов. При этом один и тот же фермент у двух видов может иметь различную аминокислотную последовательность, а следовательно, разную подвижность в полиакриламидном геле при разделении под действием электрического тока. У *P. esculentus*, вследствие ее гибридной природы, многие кодирующие белки гены находятся в гетерозиготной форме, т.е. один локус состоит из двух различных аллелей, один из которых специфичен для *P. lessonae*, а другой — для *P. ridibundus* [2, 5]. Поэтому в случае гибридной лягушки на электрофореграмме будут одновременно видны зоны белков, характерных для обоих родительских видов. Таким образом, метод аллозимного анализа позволяет достоверно отличать гибридов от обоих родительских видов. Наиболее часто для аллозимного анализа используются ферменты лактатдегидрогеназа, глюкозофосфатизомераза, аспаратаминотрансфераза



Различия между хромосомами *P. ridibundus* и *P. lessonae* на примере метафазных хромосом (а–в). Картирование повтора (TTAGGG)_n с помощью FISH на метафазных хромосомах *P. ridibundus* (а), *P. lessonae* (б, б1, б2) и диплоидной *P. esculentus* (в). Звездочки обозначают увеличенные фрагменты с ядрышкообразующими хромосомами *P. lessonae* (б1, б2). Стрелками отмечены один или два интерстициальных сайта повтора (TTAGGG)_n, различимых на ядрышкообразующей хромосоме. Масштабный отрезок = 10 мкм для всех микрофотографий, кроме б1, б2, где масштабный отрезок = 2 мкм.

[10, 21–23]. Однако вследствие возможной интрогрессии генов *P. ridibundus* в генофонд *P. lessonae* и наоборот необходимо использовать достаточно большое количество маркеров для точной идентификации видов [10, 22, 23]. Считается, что, в зависимости от количества специфичного аллеля гена, кодирующего фермент, в генотипе гибридной лягушки также будет варьировать и количество белкового продукта [20]. На этом основан способ различения форм триплоидных животных. Так, особь с генотипом RRL должна будет содержать в 2 раза больше белкового продукта, специфичного для *P. ridibundus*, а особь с генотипом LLR – наоборот, согласно эффекту дозы генов [20, 24]. Однако эффект дозы генов у триплоидных гибридов не всегда выражен и не всегда может быть определен по электрофореграмме, что не позволяет достоверно отличать диплоидных и триплоидных гибридов друг от друга [20, 24].

Аллозимный анализ также может быть использован для идентификации генома, передаваемого в ооцитах и яйцеклетках гибридных животных. Так, с помощью изучения белковых маркеров (лактатдегидрогеназы и глюкозофосфатизомеразы) в ооцитах диплоидных гибридов были определены белки, специфичные для протеома *P. ridibundus* [25, 26]. С использованием данного метода было показано наличие генома *P. ridibundus* в оогониях гибридных самок [27, 28]. Однако этот метод также не позволяет обнаружить ploidy гамет. К другим недостаткам аллозимного

анализа можно отнести сложность в идентификации генома, передаваемого сперматозоидами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИ- И ТРИПЛОИДНЫХ ФОРМ ПОСРЕДСТВОМ ИЗМЕРЕНИЯ РАЗМЕРА ЭРИТРОЦИТОВ

Для определения ploidy животных, в особенности в полевых условиях, достаточно широко используется метод измерения размеров эритроцитов и/или их ядер [5, 29–31]. Поскольку в ядрах эритроцитов триплоидных особей содержится большее количество хромосом, размер ядер этих клеток должен быть на 1/3 больше, чем у диплоидных особей. Это предположение также должно быть справедливо и для размеров самих эритроцитов. Измерение ядер эритроцитов или самих эритроцитов проводится по микроскопическим изображениям высушенных на воздухе мазков крови. Таким образом, можно различать диплоидных и триплоидных особей. Однако этот метод не обладает высокой точностью и его результаты не всегда отражают ploidy животного, так как в некоторых случаях возможны перекрытия размеров эритроцитов у ди- и триплоидных животных [5, 29, 31]. Это связано с тем, что размер эритроцитов положительно коррелирует с длиной тела животного [32]. Кроме того, размер эритроцитов также зависит от кислородного режима водоема, в котором была поймана особь [33].

ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО РАЗМЕРА ГЕНОМА ПО ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ DAPI

Одним из методов идентификации диплоидных и полиплоидных гибридов считается не только измерение показателя размера эритроцитов, но и оценка относительного содержания ДНК посредством измерения оптической плотности ядер эритроцитов, окрашенных флуоресцентным красителем (например, DAPI) [19, 31, 34]. Исследователями также было выдвинуто предположение, что вследствие различия размеров геномов *P. ridibundus* и *P. lessonae* возможна их идентификация с помощью измерения интенсивности флуоресценции ядер. Однако различить размеры геномов *P. ridibundus* и *P. lessonae* по интенсивности флуоресценции с помощью алгоритма, используемого исследователями, оказалось невозможно [19, 34]. Авторы считают, что эти сложности связаны с варьированием количества ДНК в геномах родительских видов, которое можно определить только посредством более точных измерений [19, 34–36].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА КАРИОТИПОВ

Одной из сложностей в изучении комплекса *P. esculentus* является морфологическое сходство метафазных хромосом родительских видов. Карิโอтип соматических клеток *P. lessonae* и *P. ridibundus* включает 13 пар хромосом ($2n = 26$ хромосом), которые почти не отличаются морфологически [3, 4]. Так, хромосомы-ортологи имеют сходную длину и центромерный индекс [3, 4].

В результате G-окрашивания, которое часто используется для установления филогенетического родства, различий в хромосомной исчерченности также не было обнаружено. Показатели дифференциальной исчерченности практически не отличаются у обоих видов, поэтому этот метод неприменим для идентификации хромосом родительских видов зеленых лягушек в карิโอטיפах гибридов [3].

Гораздо более продуктивным в идентификации хромосом родительских видов было использование C-бэндинга, а также флуоресцентного окрашивания (с использованием красителей Актиномицин D-33258, Hoechst, DAPI) препаратов митотических и мейотических метафазных хромосом [6, 27, 28, 34, 37]. Более интенсивный сигнал был обнаружен в перицентромерных районах всех хромосом *P. ridibundus*, в то время как в перицентромерных районах хромосом *P. lessonae* окра-

шивание практически полностью отсутствовало [6, 27, 28, 37]. Однако, несмотря на простоту этого метода, в некоторых случаях достаточно сложно идентифицировать интенсивное окрашивание перицентромерных районов на метафазных хромосомах, в особенности у триплоидных животных. Также следует отметить, что прицентромерные сателлитные повторы могут быть полиморфны в разных популяционных системах. Так, например, окрашивание DAPI не позволяет идентифицировать хромосомы у особей родительских видов из популяционных систем Восточной Украины [38, 39].

Методы C-бэндинга и флуоресцентного окрашивания хромосом также позволяют идентифицировать карิโอотипы оогониев и сперматогониев в головастиках гибридных лягушек, что позволило подтвердить наличие элиминации неклонального генома и эндоредупликации клонального генома [6, 27, 28].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *in situ* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ У ГИБРИДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Методом, который позволяет надежно идентифицировать хромосомные наборы родительских видов в геномах гибридов, можно считать флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Этот метод основан на различиях в относительном количестве или локализации определенных типов последовательностей у родительских видов. С помощью метода FISH была показана дифференциальная локализация сателлитного повтора RrS1 в перицентромерных районах хромосом родительских видов [40, 41]. Подобранные к центромерному повтору RrS1 зонды гибридизуются с перицентромерными районами хромосом 1–5 и 8 *P. ridibundus*, но не с перицентромерными районами хромосом *P. lessonae*. Таким образом, можно легко идентифицировать хромосомы родительских видов в карิโอטיפах диплоидных и триплоидных гибридов в соматических клетках, а также в ходе гаметогенеза самцов и раннего гаметогенеза самок [42]. Однако количество перицентромерного повтора может варьировать на хромосомах лягушек из разных популяционных систем, а разные зонды гибридизуются с перицентромерными районами с разной эффективностью. Например, в результате FISH с зондом, полученным из геномной ДНК *P. lessonae*, в перицентромерных районах всех хромосом *P. ridibundus* и *P. lessonae* из Восточной Украины наблюдалась интенсивная флуоресценция, что свидетельству-

ет об отсутствии видовой специфичности данного зонда [38].

Другим маркером, широко применяемым для идентификации хромосом у различных видов, могут служить интерстициальные сайты теломерного повтора. Интерстициальные сайты повтора (TTAGGG)_n могут возникать вследствие хромосомных перестроек, слияний теломер, а также репарации двуцепочечных разрывов [43]. В кариотипе родительских видов было обнаружено различное количество интерстициальных сайтов теломерного повтора на ядрышкообразующей хромосоме [38, 39]. Ядрышкообразующая хромосома *P. ridibundus* содержит два интерстициальных сайта теломерного повтора в длинном плече, в то время как ядрышкообразующая хромосома *P. lessonae* содержит один интерстициальный сайт теломерного повтора в длинном плече [38, 39]. К недостаткам метода FISH можно отнести трудоемкость и необходимость в дорогом оборудовании для визуализации результатов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОМНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *in situ* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХРОМОСОМ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ У ГИБРИДНЫХ ЖИВОТНЫХ

Геномная гибридизация *in situ* (GISH), а также сравнительная геномная гибридизация (CGH) являются точными методами для идентификации хромосом родительских видов у гибридных животных различной ploидности. Эти методы основываются на том, что геномы различных организмов, даже близкородственных видов, содержат видоспецифичные повторяющиеся последовательности, диспергированные по геному, такие как ретротранспозоны [44, 45]. В случае применения метода GISH для идентификации хромосом гибридного животного в качестве зонда используется геномная ДНК одного родительского вида, которая конкурентно ко-гибридуется с гомологичными последовательностями на хромосомах гибрида. При этом в качестве конкурентной ДНК используется геномная ДНК другого родительского вида, чтобы исключить из гибридизации фрагменты ДНК, общие для обоих родительских видов [45]. В отличие от GISH для CGH используется одновременное добавление зондов к каждому из геномов в геноме гибрида, а также геномной ДНК обоих родительских видов. В результате наблюдается дифференциальная гибридизация хромосом одного из родительских видов (в случае GISH) или обоих родительских видов (в случае CGH) в кариотипе гибрида [45].

Метод GISH был использован для идентификации хромосом *P. ridibundus* и *P. lessonae* в соматических клетках, а также в сперматогониях диплоидных гибридов [46, 47]. GISH позволяет не только различить хромосомы родительских видов, но и выявить возможные хромосомные перестройки и рекомбинацию между гетероспецифичными хромосомами родительских видов [46].

К недостаткам этих подходов можно отнести трудоемкость и дороговизну используемых оборудования и реактивов. Кроме того, авторы отмечают отсутствие видоспецифичной геномной *in situ* гибридизации для 14 из 18 особей *P. esculentus* [47].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ ПЦР-АНАЛИЗА

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации геномов родительских видов основано на различии в длине интрона первого гена сывороточного альбумина у родительских видов. Эти различия связаны с присутствием ретротранспозона RanaCR1 в интроне гена сывороточного альбумина у *P. ridibundus*, но не *P. lessonae* [48, 49]. В результате продукты ПЦР обоих родительских видов будут отличаться по длине. У гибридных животных продукты ПЦР будут содержать длинный и короткий фрагменты [49]. Этот метод характеризуется достаточной простотой и позволяет за короткое время обработать большое количество материала. К тому же для анализа достаточно малого количества материала (кончик пальца), который можно брать как из живых особей, так и зафиксированных в спирте [49, 50]. Однако к существенным недостаткам данного метода можно отнести сложность в идентификации гибридных особей, различающихся по уровню ploидности. Для идентификации особей с генотипами LR, LLR и RRL измеряется коэффициент интенсивности свечения длинного фрагмента (специфичного для *P. ridibundus*) и короткого фрагмента (специфичного для *P. lessonae*) [49]. Использование капиллярного электрофореза позволило увеличить надежность в идентификации всех форм зеленых лягушек с помощью ПЦР-анализа до 93% [49].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО АНАЛИЗА

Одной из наиболее широко применяемых методик изучения представителей комплекса зеленых лягушек в настоящее время является использование микросателлитных маркеров. Микроса-

теллиты — это массивы tandemно повторяющейся ДНК с длиной структурной единицы, не превышающей 6 нуклеотидов. Они обладают высокой мутабельностью вследствие ошибок репликации ДНК в клетках зародышевой линии, что ведет к вариативности в количестве повторов. Эти вариации оцениваются путем ПЦР с праймерами, подобранными к последовательностям, фланкирующим высокоповторяющиеся районы [51, 52]. Анализ микросателлитных локусов чрезвычайно информативен, быстр и надежен. Для каждой особи может быть проанализировано большое число индивидуальных локусов с использованием минимального количества любой ткани (обычно кончик пальца). Определены локусы, которые характерны только для генома *P. lessonae* или только для генома *P. ridibundus*. Кроме того, были обнаружены микросателлитные локусы, которые встречаются у обоих родителей, но различаются по длине в геноме каждого из родительских видов. Такие локусы могут быть использованы для оценки относительного количества аллелей родительских видов в геноме гибрида. Их использование возможно в результате сравнения интенсивности флуоресценции ПЦР-продуктов таких аллелей друг с другом, что позволяет идентифицировать диплоидных и обе формы триплоидных лягушек [12–14, 52].

Микросателлитный анализ также используется для оценки генетического разнообразия особей и для доказательства рекомбинации между гомо- и гетероспецифичными геномами у гибридов различной ploидности [12–14, 52].

Однако высокая вариативность микросателлитных последовательностей является и недостатком этого метода. Такая вариативность может быть связана с наличием нулевых аллелей, которые могут отсутствовать в одном из геномов, в результате чего усложняется интерпретация результатов. Кроме того, необходима проверка и поиск тех микросателлитных локусов, которые будут подходить для достоверной идентификации представителей зеленых лягушек из каждой популяционной системы [12–14, 52].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОДИТЕЛЬСКИХ ВИДОВ И ГИБРИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК С ПОМОЩЬЮ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА

Впервые рестрикционный анализ для идентификации *P. ridibundus* и *P. lessonae* был применен в 1984 г. для митохондриальных последовательностей [53]. Митохондриальная ДНК переваривалась различными рестриктазами (наиболее эф-

фективными были рестриктазы *Bgl*II, *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Hpa*I), после чего проводилось электрофоретическое разделение полученных фрагментов ДНК в агарозном геле. По различной длине фрагментов можно было определить особей *P. ridibundus* и *P. lessonae*. Однако использование метода рестрикционного анализа не является надежным ввиду интрогрессии у некоторых *P. ridibundus* митохондриальных генов *P. lessonae*. Дальнейшие исследования показали, что такая интрогрессия не только отдельных митохондриальных генов, но и целых митохондриальных геномов осуществляется посредством гибридных лягушек [54]. Поэтому в некоторых популяционных системах (особенно в Северной и Центральной Европе) представители *P. ridibundus* (и иногда *P. esculentus*) содержат митохондриальные геномы другого родительского вида — *P. lessonae* [53, 54].

Вместе с тем С. Патрель и соавторы предложили использовать для рестрикционного анализа последовательность ITS2 (Internal transcribed spacer 2) [55], которая находится между генами 5.8S и 28S рДНК. К ее отличительным особенностям можно отнести высокую вариативность у различных видов [56]. Для проверки эффективности выбранного маркера была проанализирована большая выборка представителей родительских видов (28 мест сбора материала в Европе и Азии). Исследуемая последовательность после амплификации переваривалась тремя различными рестриктазами (*Kpn*I, *Hae*II и *Sma*I). Для подтверждения рестрикционного анализа был использован метод аллозимного анализа [55]. Соответствие результатов составило около 83%, что недостаточно высоко для надежной идентификации родительских видов. Кроме того, метод рестрикционного анализа не может быть использован для идентификации диплоидных и триплоидных гибридов [55].

ОЦЕНКА РАЗМЕРА ГЕНОМА ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ДНК-ЦИТОМЕТРИИ

Надежным подходом, который позволяет идентифицировать всех представителей зеленых лягушек, является измерение количества ДНК в клетках с помощью проточной ДНК-цитометрии. Этот метод основан на оценке количества ДНК в ядре клетки посредством измерения рассеивания света лазерного луча при прохождении через него клеток в потоке жидкости. Использование этого метода для идентификации родительских видов и гибридов лягушек основано на том, что у *P. ridibundus* количество ДНК примерно на

16% больше, чем у *P. lessonae* (что соответствует 14 пг ДНК на диплоидный набор у *P. lessonae* и 16 пг ДНК у *P. ridibundus*) [35, 36, 57]. Таким образом, достаточно легко определяются диплоидные гибридные лягушки (15 пг ДНК в диплоидном наборе) и триплоидные гибриды (23 пг ДНК соответствует генотипу RRL, а 22 пг ДНК — генотипу LLR) [35, 36, 57]. Этот метод одинаково хорошо подходит для определения количества ДНК как в соматических клетках (эритроциты), так и в спермиях самцов [35, 36, 57]. К недостаткам этого метода относят высокую стоимость оборудования, а также возможные сложности в интерпретации получаемых данных. Метод проточной ДНК-цитометрии не позволяет также проводить анализ гамет самок вследствие значительного размера этих клеток и большого количества желтка.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КАРИОТИПОВ ООЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ХРОМОСОМ ТИПА ЛАМПОВЫХ ЩЕТОК

Идентификация геномов, передаваемых с гаметами самок, представляет сложную задачу. Ооциты представляют собой очень большие клетки (до 4 мм в диаметре) и содержат слишком много желтка, чтобы из них можно было получить хромосомные препараты с помощью стандартных методик. Методом, который позволяет не только определить количество хромосом в ооцитах, но и идентифицировать видоспецифичные отличительные черты в морфологии хромосом, является анализ наборов хромосом типа ламповых щеток, микрохирургически выделенных из ядер растущих ооцитов [58]. Хромосомы типа ламповых щеток (ЛЩ) представляют собой форму мейотических хромосом, которые встречаются в растущих ооцитах позвоночных животных, кроме сумчатых и плацентарных млекопитающих, на стадии диплотены первого мейоза. Эти хромосомы представлены бивалентами, где гомологичные хромосомы объединены хиазмами. На хромосомах типа ламповых щеток присутствуют различные маркерные структуры (особые латеральные петли, осевые гранулы и сферические тельца различной природы) и блоки конденсированного хроматина (крупные хромомеры), которые служат надежными признаками для точной идентификации отдельных хромосом [58–62]. Для родительских видов зеленых лягушек обнаружены видоспецифичные различия в количестве и расположении маркерных структур на хромосомах типа ламповых щеток, которые позволяют идентифицировать тип хромосомного набора, передаваемый в ооцитах гибридов [37–39]. Для упрощения иден-

тификации хромосом эти различия также отражены в цитологических картах [38]. Так, хромосомы типа ламповых щеток В, D, E, F, G, H и I *P. ridibundus* из Восточной Украины характеризуются видоспецифичными отличиями в количестве и расположении маркерных петель, а также наличием ассоциированных с хромосомой H ядрышек. В то же время хромосомы типа ламповых щеток В, С, E, F, G, H, L *P. lessonae* из Восточной Украины обладают видоспецифичными отличиями в расположении маркерных петель, ассоциированных с хромосомами сфер, а также отсутствием ассоциированных с хромосомами ядрышек [38]. Полученные карты хромосом типа ламповых щеток были успешно использованы для идентификации родительских хромосом в наборах уни- и бивалентов на стадии ламповых щеток в ооцитах гибридов различной ploidy [39].

Однако этот метод является достаточно длительным и трудоемким. Кроме того, с помощью анализа хромосом типа ламповых щеток можно проанализировать только ограниченное количество ооцитов из целого яичника.

Однако, несмотря на обилие различных методов, большинство из них не являются универсальными и однозначными для идентификации особей зеленых лягушек. Например, начиная с ранних исследований аллозимный анализ сочетали с анализом размеров эритроцитов, а также с простым кариотипированием для идентификации ploidy животных [5, 6, 10, 22, 27, 28]. К тому же применение нескольких различных методов необходимо для идентификации геномов, передаваемых в гаметах гибридных животных, которые представляют более специализированные клетки, зачастую требующие специфичных подходов. Так, после идентификации геномов взрослых особей с помощью проточной ДНК-цитометрии, кариотипирования или FISH-картирования определение передаваемых с ооцитами геномов возможно с помощью анализа наборов хромосом типа ламповых щеток или анализа аллозимов [37, 39]. Таким образом, преимущество в идентификации родительских геномов в клетках гибридных животных дает сочетание нескольких современных методов и подходов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-05068). Авторы выражают благодарность ресурсным центрам “Обсерватория экологической безопасности” и “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berger L. Morphology of the F1 generation of various crosses within *Rana esculenta* complex // Acta zoologica cracoviensia. 1968. V. 13(13). P. 301–324.
2. Tunner H.G. Demonstration of the hybrid origin of the common green frog *Rana esculenta* L. // Naturwissenschaften. 1973. V. 60(10). P. 481–482. doi 10.1007/BF00592872
3. Heppich S. Hybridogenesis in *Rana esculenta*: C-band karyotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae* and *Rana esculenta* // Z. Zool. Syst. Evol. 1978. V. 16. P. 27–39. doi 10.1111/j.1439-0469.1978.tb00918.x
4. Koref-Santibacez S. The karyotypes of *Rana lessonae* Camerano, *Rana ridibunda* Pallas and of the hybrid form *Rana "esculenta"* Linne (Anura) // Mitt. Zool. Mus. Berlin. 1979. V. 55(1). P. 115–124.
5. Uzzell T., Berger L., Günther R. Diploid and triploid progeny from a diploid female of *Rana esculenta* (Amphibia Salientia) // P. Acad. Nat. Sci. Phila. 1975. V. 127(11). P. 81–91.
6. Heppich S., Tunner H.G., Greilhuber J. Premeiotic chromosome doubling after genome elimination during spermatogenesis of the species hybrid *Rana esculenta* // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 61. P. 101–104. doi 10.1007/BF00273874
7. Schultz R.J. Evolution and ecology of unisexual fishes // Evol. Biol. 1977. V. 10. P. 277–331.
8. Graf J.-D., Pelaz M.P. Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex // Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. N.Y.: New York State Museum Bull., 1989. P. 289–302.
9. Plötner J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche. Bielefeld: Laurenti-Verlag, 2005. 161 p.
10. Uzzell T., Günther R., Berger L. *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*: a leaky hybridogenetic system (Amphibia Salientia) // P. Acad. Nat. Sci. Phila. 1977. V. 128(9). P. 147–171.
11. Pruvost N.B.M., Hoffmann A., Reyer H.-U. Gamete production patterns, ploidy, and population genetics reveal evolutionary significant units in hybrid water frogs (*Pelophylax esculentus*) // Ecol. Evol. 2013. P. 2933–2946. doi 10.1002/ece3.687
12. Christiansen D., Fog K., Pedersen B.V., Boomsma J.J. Reproduction and hybrid load in all-hybrid populations of *Rana esculenta* water frogs in Denmark // Evolution. 2005. V. 59(6). P. 1348–1361.
13. Christiansen D., Reyer H.U. From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs // Evolution. 2009. V. 63. P. 1754–1768. doi 10.1111/j.1558-5646.2009.00673.x
14. Arioli M., Jakob C., Reyer H.-U. Genetic diversity in water frog hybrids (*Pelophylax esculentus*) varies with population structure and geographic location // Mol. Ecol. 2010. V. 19. P. 1814–1828. doi 10.1111/j.1365-294X.2010.04603.x
15. Mallet J. Hybrid speciation // Nature. 2007. V. 446. P. 279–283. doi 10.1038/nature05706
16. Mable B.K., Alexandrou M.A., Taylor M.I. Genome duplications in amphibians and fish: an extended synthesis // J. Zool. 2011. V. 284. P. 151–182. doi 10.1111/j.1469-7998.2011.00829.x
17. Plötner J., Becker C., Plötner K. Morphometric and DNA investigations into European water frogs (*Rana* kl. *esculenta* synklepton (Anura, Ranidae)) from different population systems // J. Zool. Syst. Evol. Res. 1994. V. 32(3). P. 193–210. doi 10.1111/j.1439-0469.1994.tb00482.x
18. Vorburger C. Genomic imprinting or mutation and interclonal selection in triploid hybrid frogs? A comment on Tunner // Amphibia-Reptilia. 2001. V. 22. P. 263–265.
19. Kierzkowski P., Pasko L., Rybacki M. et al. Genome dosage effect and hybrid morphology – the case of the hybridogenetic water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex // Ann. Zool. Fenn. 2011. V. 48. I. 1. P. 56–66. doi 10.5735/086.048.0106
20. Tunner H.G. Evidence for genomic imprinting in unisexual triploid hybrid frogs // Amphibia-Reptilia. 2000. V. 21. P. 135–141. doi 10.1163/156853800507327
21. Plötner J., Günther R., Schade R. Immunologische Untersuchungen zur Verwandtschaft zwischen den mitteleuropäischen Wasserfröschen des *Rana* kl. *esculenta* Synkleptons (Amphibia, Anura) und anderen Anuren-Taxa // Mitt. Zool. Museum Berlin. 1988. V. 64(2). P. 323–330.
22. Berger L., Hotz H., Roguski H. Diploid eggs of *Rana esculenta* with two *Rana ridibunda* genomes // P. Acad. Nat. Sci. Phila. 1986. V. 138(1). P. 1–13.
23. Graf J.-D., Karch E., Moreillon M.-C. Biochemical variation in the *Rana esculenta* complex: A new hybrid form related to *Rana perezii* and *Rana ridibunda* // Experientia. 1977. V. 33. P. 1582–1584.
24. Tunner H.G. The morphology and biology of triploid hybridogenetic *Rana esculenta*: does genome dosage exist? // II International Symposium on Ecology and Genetics of European Water Frogs. Wrocław, Poland, 1994. P. 505.
25. Graf J.-D., Muller W.P. Experimental gynogenesis provides evidence of hybridogenetic reproduction in the *Rana esculenta* complex // Experientia. 1979. V. 35(12). P. 1574–1576.
26. Uzzell T., Hotz H., Berger L. Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes // J. Exp. Zool. 1980. V. 214(3). P. 251–259. doi 10.1002/jez.1402140303
27. Tunner H.G., Heppich S. Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta* // Naturwissenschaften. 1981. B. 68(4). S. 207–208. doi 10.1007/BF01047207
28. Tunner H.G., Heppich-Tunner S. Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog // Naturwissenschaften. 1991. B. 78(1). S. 32–34. doi 10.1007/BF01134041
29. Berger L., Roguski H., Uzzell T. Triploid F2 progeny of water frogs (*Rana esculenta* complex) // Folia biol. (Kraków). 1978. V. 26(3). P. 135–152.
30. Ogińska-Nowak M. DNA content in erythrocyte nuclei of diploid and triploid green frog hybrids of *Rana esculenta* L. complex // Zool. Poloniae. 1978. V. 28(1). P. 109–115.
31. Ogińska M., Kazana K., Kierzkowski P. DNA content in erythrocyte nuclei of water frogs from a pure *Rana esculenta* population in Debki (Gdansk district, Poland) // Mitt. Mus. Nat. kd. Berl. Zool. Reihe. 2001. V. 77(1). P. 65–70. doi 10.1002/mmzn.20010770111
32. Polls Pelaz M.P., Graf J.-D. Erythrocyte size as an indicator of ploidy level in *Rana* kl. *Esculenta* before and after the metamorphosis // Alytes. 1988. V. 7(2). P. 53–61.

33. *Schmeller D.S., Crivelli A., Veith M.* Is triploidy indisputably determinable in hybridogenetic hybrids by planimetric analyses of erythrocytes? // *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl. Zool. Reihe.* 2001. V. 77. P. 71–77. doi 10.1002/mmzn.20010770112
34. *Ogielska M., Kierzkowski P., Rybacki M.* DNA content and genome composition of diploid and triploid water frogs belonging to the *Rana esculenta* complex (Amphibia, Anura) // *Can. J. Zool.* 2004. V. 82. P. 1894–1901. doi 10.1139/z04-188
35. *Vinogradov A.E., Borkin L.J., Gunther R., Rosanov J.M.* Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry // *Genome.* 1990. V. 33. P. 619–627. doi 10.1139/g90-092
36. *Borkin L.J., Korshunov A.V., Lada G.A. et al.* Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine // *Russ. J. Herpetol.* 2004. V. 3(11). P. 194–213.
37. *Bucci S., Ragghianti M., Mancino G. et al.* Lampbrush and mitotic chromosomes of the hemiclonally reproducing hybrid *Rana esculenta* and its parental species // *J. Exp. Zool.* 1990. V. 255(1). P. 37–56. doi 10.1002/jez.1402550107
38. *Dedukh D., Mazepa G., Shabanov D. et al.* Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine // *BMC Genetics.* 2013. V. 04. P. 14–26. doi 10.1186/1471-2156-14-26
39. *Dedukh D., Litvinchuk S., Rosanov J. et al.* Optional Endoreplication and Selective Elimination of Parental Genomes during Oogenesis in Diploid and Triploid Hybrid European Water Frogs // *PLoS One.* 2015. V. 10(4). doi 10.1371/journal.pone.0123304
40. *Ragghianti M., Guerrini F., Bucci S. et al.* Molecular characterization of a centromeric satellite DNA in the hemiclonal hybrid frog *Rana esculenta* and its parental species // *Chromosome Res.* 1995. V. 3(8). P. 497–506. doi 10.1007/BF00713965
41. *Ragghianti M., Bucci S., Casola C. et al.* Molecular investigations in western Palearctic water frogs // *Ital. J. Zool., Suppl.* 2004. V. 2. P. 17–23. doi 10.1080/11250000409356601
42. *Ragghianti M., Bucci S., Marracci S. et al.* Gametogenesis of intergroup hybrids of hemiclonal frogs // *Genet. Res.* 2007. V. 89(1). P. 39–45. doi 10.1017/S0016672307008610
43. *Lin K.W., Yan J.* Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences // *Mutat. Res.* 2008. V. 658. P. 95–110. doi 10.1016/j.mrrev.2007.08.006
44. *Kato A., Vega J.M., Han F. et al.* Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 148–154. doi 10.1016/j.pbi.2005.01.014
45. *Markova M., Vyskot B.* New horizons of genomic *in situ* hybridization // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 126(4). P. 368–375. doi 10.1159/000275796
46. *Zaleśna A., Choleva L., Ogielska M. et al.* Evidence for integrity of parental genomes in the diploid hybridogenetic water frog *Pelophylax esculentus* by genomic *in situ* hybridization // *Cytogenet. Genome Res.* 2011. V. 134. P. 206–212. doi 10.1159/000327716
47. *Doležalková M., Sember A., Marec F. et al.* Is premeiotic genome elimination an exclusive mechanism for hemiclonal reproduction in hybrid males of the genus *Pelophylax*? // *BMC Genetics.* 2016. V. 17. 100. doi 10.1186/s12863-016-0408-z
48. *Plötner J., Köhler F., Uzzell T. et al.* Evolution of serum albumin intron-1 is shaped by a 5' truncated non-long terminal repeat retrotransposon in western Palearctic water frogs (Neobatrachia) // *Mol. Phyl. Evol.* 2009. V. 53. P. 784–791. doi 10.1016/j.ympev.2009.07.037
49. *Hauswaldt J.S., Höer M., Ogielska M. et al.* A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*) // *Mol. Ecol. Resour.* 2012. V. 12. P. 797–805. doi 10.1111/j.1755-0998.2012.03160.x
50. *Mayer M., Hawlitschek O., Zahn A., Glaw F.* Composition of twenty Green Frog populations (*Pelophylax*) across Bavaria, Germany // *Salamandra.* 2013. V. 49(1). P. 31–44.
51. *Hotz H., Uzzell Th., Guex G.-D. et al.* Microsatellites: A tool for evolutionary genetic studies of western Palearctic water frogs // *Mitt. Mus. Nat. kd. Berl. Zool. Reihe.* 2001. V. 77. P. 43–50. doi 10.1002/mmzn.20010770108
52. *Christiansen D.* A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex // *Mol. Ecol. Notes.* 2005. V. 5(1). P. 190–193. doi 10.1111/j.1471-8286.2004.00869.x
53. *Spolsky C., Uzzell T.* Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81(18). P. 5802–5805.
54. *Plötner J., Uzzell T., Beerli P. et al.* Widespread unidirectional transfer of mitochondrial DNA: a case in western Palearctic water frogs // *J. Evol. Biol.* 2008. V. 21(3). P. 668–681. doi 10.1111/j.1420-9101.2008.01527.x
55. *Patrelle C., Ohst T., Picard D. et al.* A new PCR-RFLP-based method for an easier systematic affiliation of European water frogs // *Mol. Ecol. Res.* 2011. V. 11. P. 200–205. doi 10.1111/j.1755-0998.2010.02905.x
56. *Schultz J., Muller T., Achtziger M. et al.* The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. P. 704–707. doi 10.1093/nar/gkl129
57. *Vinogradov A.E., Borkin L.J., Gunther R., Rosanov J.M.* Two germ cell lineages with genomes of different species in one and the same animal // *Hereditas.* 1991. V. 114. P. 245–251. doi 10.1111/j.1601-5223.1991.tb00331.x
58. *Callan H.G.* Lampbrush Chromosomes. London: Springer-Verlag, 1986. 252 p.
59. *Macgregor H. C.* Lampbrush chromosomes and gene utilization in meiotic prophase // *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1984. V. 38. P. 333–347.
60. *Gaginskaya E.R.* The lampbrush chromosomes in the amphibian oocytes // *Tsitologiya.* 1989. V. 31. P. 1267–1291.
61. *Morgan G.T.* Lampbrush chromosomes and associated bodies: new insights into principles of nuclear structure and function // *Chromosome Res.* 2002. V. 10. P. 177–200. doi 10.1023/A:1015227020652
62. *Gall J.G., Wu Z., Murphy C., Gao H.* Structure in the amphibian germinal vesicle // *Exp. Cell Res.* 2004. V. 296. P. 28–34. doi 10.1016/j.yexcr.2004.03.017

Approaches for Studying *Pelophylax esculentus* Complex

D. V. Dedukh, A. V. Krasikova*

Department of Cytology and Gistology, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: alla.krasikova@gmail.com

European water frog complex (*Pelophylax esculentus*) represents unique and adequate system for analysis of the interspecies hybridization and of the mechanisms allowing interspecies hybrids to survive and reproduce. Difficulties in water frog species investigation includes high polymorphism of morphological features in parental species and hybrid forms. Moreover polyploid hybrid forms that exist in nature population systems make morphological recognition impossible. Since phenomenon of interspecies hybridization and hybrids reproduction was discovered, researchers faced difficulties connected with precise identification of all individuals. In this review we describe biochemical, cytogenetic and molecular approaches that were commonly used for frogs identification and analysis of genomes transmitted in gametes of hybrids. Moreover we stress advantages and disadvantages of different approaches. Presented methods can be used for analysis of other interspecies hybrid complexes including fishes, amphibians and reptilians. English translation of the paper published in Russian Journal of Genetics, 2017, Vol. 53, No. 8, is available ONLINE by subscription from: <http://www.springer.com/>, <http://link.springer.com/journal/11177>

Keywords: comparative genomic hybridization, fluorescent *in situ* hybridization, genomic *in situ* hybridization, interspecies hybridization, *Pelophylax esculentus* complex, polyploid hybrid forms.