

УДК: 597.851: 591.463.1

**Сперматогенез у триплоїдних *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) из Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек (Украина, Харьковская область)****А.Е.Кечеджи, О.В.Михайлова, Д.А.Шабанов***Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)  
bloodraven3245@rambler.ru, miholgabio@rambler.ru, d.a.shabanov@gmail.com*

Изучали сперматогенез триплоидных межвидовых гибридов зеленых лягушек методом карิโอанализа в давленных препаратах семенников. Изучены самцы *Pelophylax esculentus* из Северско-Донецкого центра разнообразия зеленых лягушек (Харьковская область, Украина). Зарегистрированы клетки, относящиеся к двум различным путям сперматогенеза. В одном случае перед редукционным делением не происходит удвоение хромосомного набора, в другом случае оно происходит. Результатом второго пути развития должно было бы стать образование диплоидных сперматозоидов. В работах других авторов, работавших с аналогичным материалом иными методами, диплоидные сперматозоиды обнаружены не были.

**Ключевые слова:** диплоидные сперматозоиды, *Pelophylax esculentus*, пути гаметогенеза, триплоидный хромосомный набор.

**Сперматогенез у триплоїдних *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) з Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб (Україна, Харківська область)****А.Є.Кечеджі, О.В.Михайлова, Д.А.Шабанов**

Вивчали сперматогенез триплоїдних міжвидових гібридів зелених жаб методом каріоаналізу в давлених препаратах сім'яників. Вивчали самців *Pelophylax esculentus* з Сіверсько-Донецького центру різноманіття зелених жаб (Харківська область, Україна). Зареєстровані клітини, які належать до двох різних шляхів сперматогенезу. В одному випадку перед редукційним поділом не відбувається подвоєння хромосомного набору, в іншому випадку воно відбувається. Результатом другого шляху розвитку мало б стати утворення диплоїдних сперматозоїдів. У роботах інших авторів, які працювали з аналогічним матеріалом іншими методами, диплоїдні сперматозоїди виявлені не були.

**Ключові слова:** диплоїдні сперматозоїди, *Pelophylax esculentus*, шляхи гаметогенезу, триплоїдний набір.

**Spermatogenesis in triploid *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) from Seversko-Donetskiy green frog's diversity center (Ukraine, Kharkiv region)****A.E.Kechedzhi, O.V.Mykhailova, D.A.Shabanov**

Spermatogenesis in triploid interspecific hybrids of green frogs has been studied using karyoanalysis in squashed preparations of the testicles. *Pelophylax esculentus* males from Seversko-Donetskiy green frogs diversity center (Ukraine, Kharkiv region) were examined. Cells belonging to two different ways of spermatogenesis were recorded. In one case, there is no doubling of the chromosome set before the reduction division, in the other case it occurs. The formation of diploid sperm should be the result of the second way of gametogenesis. Other authors, who worked with analogous material using other methods, have found no diploid sperm.

**Key words:** diploid sperm, *Pelophylax esculentus*, ways of gametogenesis, triploid chromosome set.

**Постановка проблеми**

Гбридогенная группа зеленых лягушек, *Pelophylax esculentus* complex, является одной из моделей для изучения гемиклонального наследования. Межвидовые гибриды, для обозначения которых традиционно используется название съедобная лягушка, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), возникают в результате скрещивания прудовой лягушки, *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) и озерной лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). Существование *Pelophylax esculentus* во многих поколениях поддерживается благодаря тому, что при гаметогенезе гибридных особей в гаметы переходит (в типичном случае) только один из родительских геномов. Разные представители *Pelophylax esculentus* complex способны обитать и размножаться совместно, образуя гемиклональные

популяционные системы, ГПС (Шабанов та ін., 2009; Шабанов, Литвинчук, 2010). Для Западной Европы характерны ГПС, где совместно обитают *P. esculentus*, производящие гаметы с геномами *P. ridibundus* (далее – R), а также *P. lessonae*. При их скрещивании опять образуются *P. esculentus*, клонально передающие геномы *P. ridibundus*.

Для Восточной Украины более характерны ГПС, где совместно обитают *P. esculentus*, производящие гаметы *P. lessonae* (далее – L), а также *P. ridibundus*. Например, такие ГПС распространены в черте города Харькова (Коршунов, 2010). Однако существуют и ГПС зеленых лягушек более сложного состава. Так, в бассейне р. Северский Донец описан Северско-Донецкий центр разнообразия зеленых лягушек, характеризующийся значительно более сложным составом ГПС (Шабанов та ін., 2009; Шабанов, Литвинчук, 2010). Среди диплоидных *P. esculentus* в нем найдены особи, которые производят гаметы L, R, а также и L, и R одновременно (Боркин и др., 2005).

Еще одной особенностью Северско-Донецкого центра является то, что в нем отсутствуют половозрелые *P. lessonae*, и, следовательно, все геномы этого вида клонально передаются через гибридных особей в течение многих поколений (Коршунов, 2010). Этот регион массового распространения триплоидных гибридов зеленых лягушек изолирован от других областей их распространения в Западной и Центральной Европе (Borkin et al., 2004). Гибриды с тройным набором хромосом могут содержать в двойной дозе геном *P. ridibundus* (генотип LRR) или два генома *P. lessonae* (генотип RLL); особи первой группы встречаются в названном центре чаще.

Очевидно, что воспроизводство как диплоидных, так и триплоидных полуклональных межвидовых гибридов обеспечивается специфичной перестройкой их гаметогенеза. Гаметогенез гибридных лягушек изучался австрийскими учеными на популяциях из Западной Европы с использованием флуоресцентной микроскопии и электрофореза (Tunner, Heppich-Tunner, 1991 и др.). Они показали, что неклональный геном удаляется из клеток зародышевой линии ещё до начала мейоза. Это происходит во время митотических делений клеток зародышевой линии. После этого, либо сразу же, либо (только у самок) в мейозе до стадии диплотены профазы I, происходит удвоение клонального генома путём эндоредупликации. Подобный механизм имеет место у диплоидных особей. У гибридов с тройным хромосомным набором гаметогенез, по литературным данным (см. Plötner, 2005), проходит несколько иначе. Элиминация генома, находящегося в меньшинстве, как и у диплоидов в типичном случае, происходит во время митотических делений половых клеток. Вследствие этого на стадии мейоза оказываются клетки с диплоидным набором хромосом одного из родительских видов, удвоения которого в большинстве случаев не происходит (Plötner, 2005). Мейоз при этом проходит типичным для диплоидных особей образом.

Согласно литературным данным (Plötner, 2005), триплоиды в большинстве случаев возникают в результате оплодотворения диплоидной яйцеклетки гаплоидным сперматозоидом. Вариант, при котором они получаются в результате комбинации гаплоидной яйцеклетки и диплоидного сперматозоида, считается редким исключением.

Отклонения от описанных для гемиклональных гибридов механизмов наследования были обнаружены во французских и венгерских популяциях *Pelophylax esculentus* (Graf, Polls Pelaz, 1989; Polls Pelaz, 1994; Tunner, Heppich-Tunner, 1992; Brychta, Tunner, 1994; цит. по Plötner, 2005). В этих популяциях триплоиды представлены только LLR-самцами, у которых происходит элиминация R-генома до начала мейоза, и образуются диплоидные сперматозоиды с двумя геномами прудовой лягушки (LL-сперматозоиды). Воспроизводство LLR-самцов в этих популяциях происходит путем комбинации диплоидных LL-сперматозоидов с гаплоидными R-яйцеклетками.

Гаметогенез *Pelophylax esculentus* из Северско-Донецкого центра разнообразия изучался тремя разными методами: при помощи проточной ДНК-цитометрии суспензии сперматозоидов (Боркин и др., 2005); благодаря изучению препаратов хромосом из разрушенных клеток (Сурыдна, 2005; Манило и др., 2007); при помощи электрофоретического анализа суспензии половых клеток (Межжерин и др., 2007; Морозов-Леонов и др., 2009). В настоящее время ведутся работы по изучению овогенеза *Pelophylax esculentus* при помощи маркеров хромосом типа ламповых щеток (Dedukh et al., 2011). Тем не менее, для Северско-Донецкого центра механизм массового воспроизводства триплоидов так и не выяснен. Остается неясным, какие именно лягушки систематически производят диплоидные гаметы, обеспечивающие появление триплоидов. Тем более, остается невыясненным, какие именно изменения в ходе гаметогенеза у этих лягушек приводят к появлению диплоидных гамет. Эта ситуация делает ценными любые новые данные по гаметогенезу гибридных лягушек из Северско-Донецкого центра разнообразия *Pelophylax esculentus* complex.

### Матеріал і методи

В ході роботи були вивчені семенники 7 триплоїдних половозрілих самців *Pelophylax esculentus* із Сіверсько-Донецького центру різноманітності зелених лягушок, отловлених весною і восени 2010–2011 гг. в околицях Біологічної станції Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна (с. Гайдары Змієвського району Харківської області). Предварительне визначення зелених лягушок як *P. esculentus* або *P. ridibundus* проводилося по комплексу зовнішніх ознак (Шабанов і др., 2006). Остаточне визначення ґрунтувалося на даних проточної ДНК-цитометрії, яка виконувалася С.Н.Литвинчуком і Ю.М.Розановим в ЦІН РАН (г. Санкт-Петербург). Визначення плоидності проводилося на основі вимірювання розмірів еритроцитів (Бондарева, Шабанов, 2011) розглянутих лягушок, а також підрахунком хромосом в клітках епітелію тонкого кишечника. Для трьох самців застосування ДНК-цитометрії дозволило визначити генотипи призводимої ими гаплоїдної сперми.

В роботі використовувалася методика каріоаналізу в пресованих препаратах по В.В.Клименко (Клименко, 2001) з деякими модифікаціями. Зразки тканин семенників поміщали не менше ніж на 2 доби в фіксатор із однієї об'ємної частини ледяної оцтової кислоти і трьох частей 96% етанолу з протравкою із оцтоножелезної кислоти (III). Далі зразок переносили в 40% розчин гематоксилину в ледяній оцтової кислоті. Фарбування проводилося при  $t=66-68^{\circ}\text{C}$ , час експозиції 1–1,5 год. Після фарбування фрагмент тканини переносили в ацетохлоралгідрат для вимивання надлишків фарби. Далі шматочок тканини поміщали на предметне скло і накривали покривним. Надавливали на покривне скло кончиком препарувальної игли, добивалися роздавлювання зразка до шару в одну клітку (Михайлова і др., 2011). Підготовлений таким чином препарат мікроскопірували і фотографували з допомогою USB-камери.

Отримані каріопрепарати відносили до певних або інших стадій мітозу або мейозу на основі характерних особливостей хромосом або бивалентів. Далі по зареєстрованій сукупності етапів гаметогенезу реконструювали особливості його протікання. Результат роботи носить якісний (описання спостережуваних шляхів гаметогенезу), а не кількісний характер.

### Результати і обговорення

В ході роботи у вивчених триплоїдних гібридів ми виявили відхилення від звичайного протікання сперматогенезу. В семенниках поряд з клітками нормальної плоидності ( $1n$ ,  $2n$ ,  $3n$ ) були виявлені анеуплоїдні клітки на різних стадіях мітозу і мейозу, кількість хромосом в яких відрізнялася від кратного  $n$  (рис. 1).

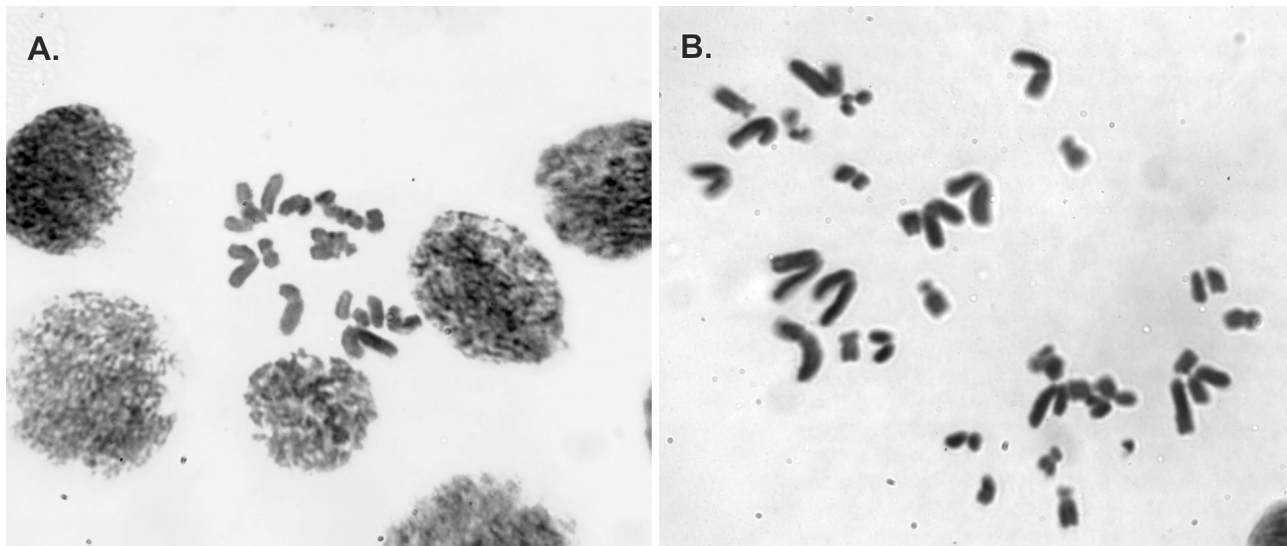


Рис. 1. Анеуплоїдні хромосомні набори в клітках зародкової лінії у триплоїдних самців *Pelophylax esculentus*

Примечания: А – метафаза, кількість хромосом менше триплоїдного (32), В – кількість хромосом менше диплоїдного (16)

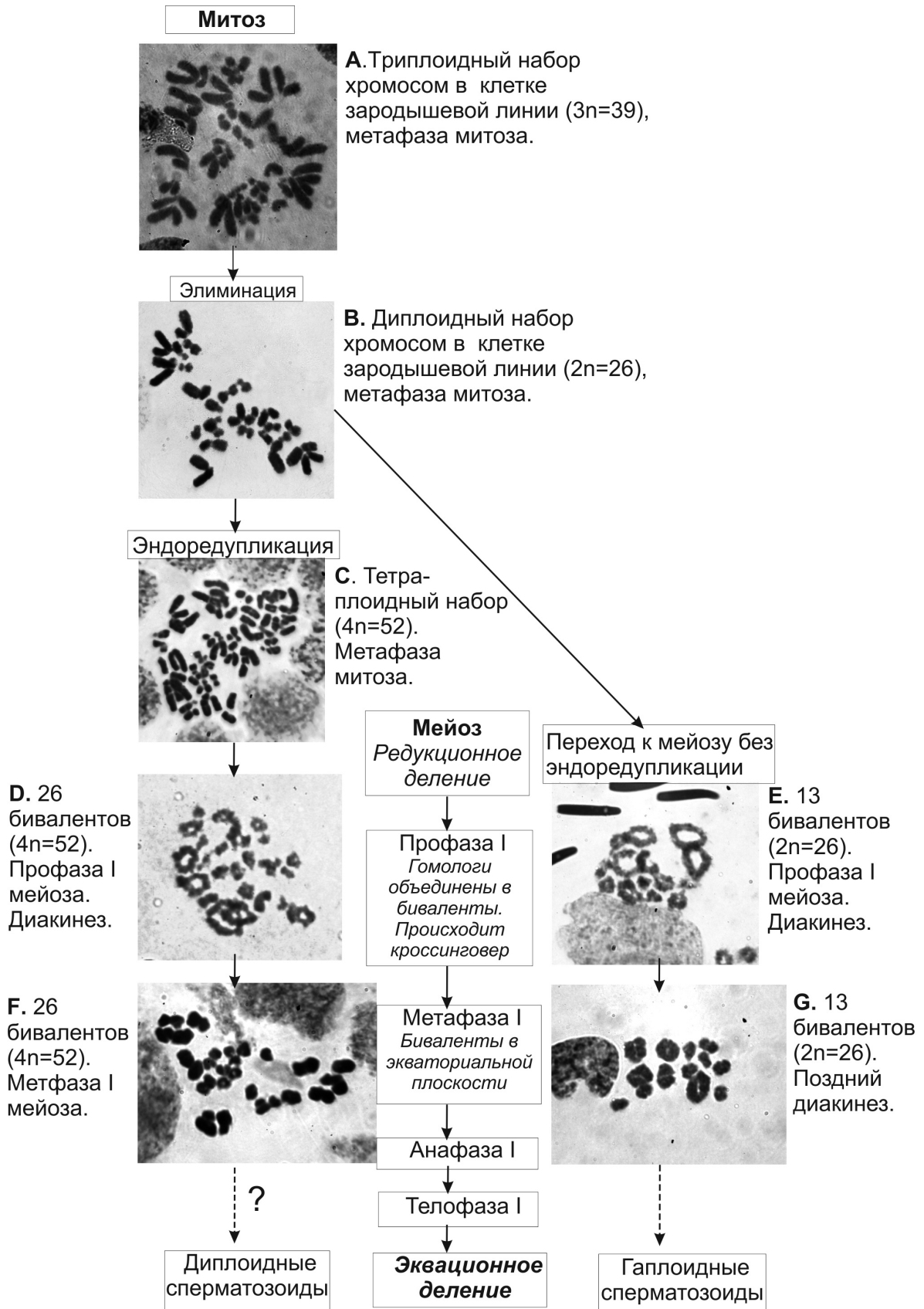


Рис. 2. Схема двух путей сперматогенеза у триплоидных *Pelophylax esculentus* из Северско-Донецкого центра разнообразия

Кроме того, мы выяснили, что сам процесс образования половых клеток у триплоидных гибридных особей из Северско-Донецкого центра разнообразия может проходить двумя путями: с эндоредупликацией генома или без нее (рис. 2). В случае нормального течения сперматогенеза, на стадии пролиферации триплоидных сперматогониев (рис. 2, В) происходит элиминация одного из геномов, по-видимому, находящегося в меньшинстве. Получившаяся диплоидная клетка (рис. 2, В) без удвоения генома вступает в мейоз (рис. 2, Е, G), и далее гаметогенез идет по обычной схеме, характерной для диплоидных особей. В результате образуются нормальные гаплоидные сперматозоиды.

В ином случае после элиминации неклонального генома происходит удвоение оставшегося диплоидного набора до тетраплоидного (LLLL или RRRR сперматогонии), который впоследствии проходит псевдонормальный мейоз (рис. 2, D, F), который (при условии прохождения до конца) должен был бы приводить к формированию диплоидных сперматозоидов. Так как удвоение генома во время мейоза у самцов не описано (Plötner, 2005), можно предположить, что эндоредупликация происходила у исследуемых гибридных самцов в ходе многочисленных митотических делений сперматогониев после элиминации. Это предположение подтверждается находками в семенниках некоторых изученных особей тетраплоидных хромосомных наборов на стадии метафазы митоза (рис. 2, С), а также аномально больших интерфазных ядер. Следует упомянуть, что тетраплоидные клетки были также обнаружены нами у отдельных диплоидных особей (Михайлова и др., 2011). Однако такое отклонение от нормального течения гаметогенеза наблюдалось только у двух из восемнадцати изученных диплоидных самцов.

Для трех из изученных нами триплоидных самцов методом проточной ДНК-цитометрии Ю.М.Розанов и С.Н.Литвинчук (Цитологический институт РАН, г. Санкт-Петербург) определили их генотипы, а также тип и относительное количество гаплоидной спермы. Все три особи имели генотип LRR. Для двух из этих LRR-самцов доля гаплоидной спермы составила 33% и 42%, а тип гамет был определен как R. В семенниках каждой из трёх особей мы обнаружили хромосомные наборы, характерные для обоих путей сперматогенеза («гаплоидного» и «диплоидного»). Для третьего из изученных с помощью проточной цитометрии самцов не удалось определить тип гаплоидной спермы, а её доля оказалась равна всего 3%. В ходе кареоанализа ткани семенника этой особи мы выяснили, что большинство наблюдаемых клеток находятся на стадии профазы мейоза и являются тетраплоидными (26 бивалентов), т.е. относятся к «диплоидному» пути сперматогенеза. Нормальный диплоидный набор хромосом, то есть 13 бивалентов в профазе мейоза, характерных для «гаплоидного» пути сперматогенеза, наблюдался лишь в единичных клетках. В то же время, следует подчеркнуть, что данные проточной ДНК-цитометрии всех трех особей не дают основания предполагать наличия у них диплоидной спермы (С.Н.Литвинчук, личное сообщение). В иных случаях при исследовании самцов с генотипом LRR также было установлено, что они производят исключительно гаплоидные R-гаметы (Морозов-Леонов и др., 2009).

Таким образом, в результате нашей работы зарегистрирована парадоксальная ситуация. Значительная (в некоторых случаях – преобладающая) часть клеток зародышевого пути у триплоидных самцов *P. esculentus* развивается по пути, который должен был бы приводить к формированию диплоидной спермы. Такое производство диплоидных мужских гамет могло бы стать одним из объяснений широкого распространения триплоидных гибридов в Северско-Донецком центре разнообразия зеленых лягушек. Тем не менее, с помощью иных методов исследования диплоидные гаметы (по крайней мере в значительном количестве) у триплоидных самцов зарегистрированы не были.

Описанная проблема нуждается в дальнейшем изучении с применением возможно более широкого круга методов изучения гаметогенеза.

### Благодарности

В ходе своей работы авторы получали неоценимую помощь от многих коллег. В сборе изученного материала участвовали А.В.Коршунов, М.А.Кравченко, Г.А.Мазепа, в определении плоидности собранных лягушек – А.А.Бондарева. В освоении методики давленных препаратов авторам помогли В.В.Клименко и Е.А.Киося. Исследования части изученного материала при помощи проточной ДНК-цитометрии были выполнены С.Н.Литвинчуком и Ю.М.Розановым. При обсуждении рукописи статьи авторы получили неоценимые критические замечания от С.Н.Литвинчука. Авторы искренне благодарят всех названных коллег.

### Список литературы

Бондарева А.А., Шабанов Д.А. Сравнение размера и формы эритроцитов у диплоидных и триплоидных гибридов зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus*) // Всеукраїнський конкурс студентських наукових робіт з біологічних наук: матеріали підсумкової науково-практичної конференції. – Мелітополь: «Люкс», 2011. – С. 11–14. /Bondareva A.A., Shabanov D.A. Sravneniye razmera i formy

eritrotsitov u diploidnykh i triploidnykh gibridov zelenykh lyagushek (*Pelophylax esculentus*) // Vseukrains'kyi konkurs students'kykh naukovykh robot z biologichnykh nauk: materialy pidsumkovoi naukovo-praktychnoi konferentsii. – Melitopol': «Lyuks», 2011. – S. 11–14./

Боркин Л.Я., Зиненко А.И., Коршунов А.В. и др. Массовая полиплоидия в гибридном комплексе *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) на Востоке Украины // Матеріали Першої конференції Українського Герпетологічного Товариства – К.: Зоомузей ННПМ НАНУ, 2005. – С. 23–26. /Borkin L.Ya., Zinenko A.I., Korshunov A.V. i dr. Massovaya poliploidiya v gibridennom komplekse *Rana esculenta* (Ranidae, Anura, Amphibia) na Vostoke Ukrainy // Materialy Pershoi konferentsii Ukrains'kogo Gerpetologichnogo Tovarystva – K.: Zoomuzei NNPM NANU, 2005. – S. 23–26./

Коршунов А.В. Экологические закономерности распределения *Pelophylax esculentus* complex в биотопах бассейна верхнего течения реки Северский Донец. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук (03.00.16. – экология). – Днепропетровск, 2010. – 21с. /Korshunov A.V. Ekologicheskiye zakonomernosti raspredeleniya Pelophylax esculentus complex v biotopakh basseyna verkhnego techeniya reki Severskii Donets. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk (03.00.16. – ekologiya). – Dnepropetrovsk, 2010. – 21p. /

Манило В.В., Радченко В.И., Коршунов А.В. Исследование кариотипа съедобной лягушки (*Rana kl. esculenta*) из Харьковской области Украины // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія Біологія. – 2007. – Вип.21. – С. 68–73. /Manilo V.V., Radchenko V.I., Korshunov A.V. Issledovaniye kariotipa s'yedobnoy lyagushki (Rana kl. esculenta) iz Khar'kovskoy oblasti Ukrainy // Naukovyy visnyk Uzhgorodskogo universytetu. Seriya Biologiya. – 2007. – Vyp.21. – S. 68–73./

Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю., Некрасова О.Д. и др. Эволюционно-генетические аспекты полуклонального воспроизводства гибридной формы *Rana kl. esculenta* (Amphibia, Ranidae) // Науковий вісник Ужгородського ун-ту: Серія Біологія. – 2007. – Вип.21. – С. 79–84. /Mezhzherin S.V., Morozov-Leonov S.Yu., Nekrasova O.D. i dr. Evolyutsionno-geneticheskiye aspekty poluklonaalnogo vosproizvodstva gibridnoy formy Rana kl. esculenta (Amphibia, Ranidae) // Naukovyy visnyk Uzhgorodsk'kogo un-tu: Seriya Biologiya. – 2007. – Vyp.21. – S. 79–84./

Михайлова О.В., Кечеджи А.Е., Шабанов Д.А. Изучение сперматогенеза у диплоидных *Pelophylax esculentus* (Amphibia, Anura) при помощи кареоанализа в раздавленных препаратах // Праці Українського герпетологічного товариства. – 2011. – №3. – С. 120–127. /Mykhaylova O.V., Kchedzhi A.Ye., Shabanov D.A. Izucheniye spermatogeneza u diploidnykh Pelophylax esculentus (Amphibia, Anura) pri pomoshchi kariouanaliza v razdavlennykh preparatakh // Pratsi Ukrains'kogo gerpetologichnogo tovarystva. – 2011. – №3. – S. 120–127./

Морозов-Леонов С.Ю., Межжерин С.В., Некрасова О.Д. и др. Наследование родительских геномов гибридной формой *Rana "esculenta"* (Amphibia, Ranidae) // Генетика. – 2009. – Т.45, №4. – С. 488–495. /Morozov-Leonov S.Yu., Mezherin S.V., Nekrasova O.D. i dr. Nasledovaniye roditel'skikh genomov gibridnoy formoy Rana "esculenta" (Amphibia, Ranidae) // Genetika. – 2009. – T.45, №4. – S. 488–495./

Сурядна Н.М. Зелені жаби фауни України: морфологічна мінливість, каріологія та особливості біології. Автореф. дис. ... канд. биол. наук (03.00.16. – екологія). – Київ, 2005. – 21 с. /Suryadna N.M. Zeleni zhaby fauny Ukrainy: morfologichna minlyvist', kariologiya ta osoblyvosti biologii. Avtoref. dys. ... kand. biol. nauk (03.00.16. – ekologiya). – Kyiv, 2005. – 21 p./

Шабанов Д.А., Зиненко А.И., Коршунов А.В. и др. Изучение популяционных систем зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) в Харьковской области: история, современное состояние и перспективы // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вип.3 (№729). – С. 208–220. /Shabanov D.A., Zinenko A.I., Korshunov A.V. i dr. Izucheniye populyatsionnykh sistem zelenykh lyagushek (Rana esculenta complex) v Khar'kovskoy oblasti: istoriya, sovremennoye sostoyaniye i perspektivy // Visnyk Kharkivsk'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2006. – Vyp.3 (№729). – S. 208–220./

Шабанов Д.А., Коршунов О.В., Кравченко М.О. Які ж зелені жаби населяють Харківську область? Термінологічний і номенклатурний аспекти проблеми // Біологія та валеологія. – Вип.11. – Харків: ХДПУ, 2009. – С. 116–125. /Shabanov D.A., Korshunov O.V., Kravchenko M.O. Yaki zh zeleni zhaby naselyayut' Kharkivsk'ku oblast'? Terminologichnyy i nomenklaturnyy aspekty problemy // Biologiya ta valeologiya. – Vyp.11. – Kharkiv: KhDPU, 2009. – S. 116–125./

Шабанов Д.А., Литвинчук С.Н. Зеленые лягушки: жизнь без правил или особый способ эволюции // Природа. – 2010. – №3 (1135). – С. 29–36. /Shabanov D.A., Litvinchuk S.N. Zelenyye lyagushki: zhizn' bez pravil ili osobyby sposob evolyutsii // Priroda. – 2010. – №3 (1135). – S. 29–36./

Borkin L.J., Korshunov A.V., Lada G.A. et al. Mass occurrence of polyploid green frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine // Russian Journal of Herpetology. – 2004. – Vol.11, №3. – P. 194–213.

Dedukh D., Masepa G., Shabanov D. et al. Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs // 18th International Chromosome Conference. Speaker abstracts. – Manchester, UK, 2011. – P. 48–49.

Klymenko V.V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori*: problems and prospects // J. Insect Biotechnol. and Sericol. – 2001. – Vol.70. – P. 155–165.

Plötner J. Die westpaläarktischen Wasserfrösche. – Bielefeld: Laurenti-Verlag, 2005. – 161S.

Tunner N.G., Heppich-Tunner S. Genome exclusion and two strategies of chromosome duplication in oogenesis of a hybrid frog // Naturwissenschaften. – 1991. – Vol.78. – P. 32–34.

**Представлено: С.М.Литвинчук / Presented by: S.M.Litvinchuk**  
**Рецензент: А.В.Некрасова / Reviewer: A.V.Nekrasova**  
*Подано до редакції / Received: 20.10.2011*