ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ *BM224* И *Bcal7* В ПОПУЛЯЦИЯХ ЗЕЛЕНЫХ ЖАБ (*BUFO VIRIDIS* COMPLEX), РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО РАЗМЕРУ ГЕНОМА И ПЛОИДНОСТИ

© *С. Н. Литвинчук,*[1] *Ю. М. Розанов,*[1] *Н. М. Усманова,*[1] *Л. Я. Боркин,*[2] *Л. Ф. Мазанаева,*[3] *В. И. Казаков*[1]

[1] *Институт цитологии РАН,* [2] *Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, и* [3] *Дагестанский государственный университет, Махачкала; электронный адрес: slitvinchuk@yahoo.com*

Впервые изучена изменчивость микросателлитов *BM224* и *Bcal7* у трех видов диплоидно-полиплоидного комплекса *Bufo viridis* — *B. viridis*, *B. oblongus* и *B. pewzowi*. Обнаружено, что локус *Bcal7* во всех изученных нами выборках мономорфен. У микросателлита *BM224* найдены три аллельных варианта. Среди тетраплоидных жаб западный вид *B. oblongus* характеризовался только одним аллелем, восточный — *B. pewzowi* — двумя другими. Сходное распределение было отмечено и у триплоидных особей, найденных на границах обитания тетраплоидных и диплоидных видов. Среди выборок диплоидного вида *B. viridis* были отмечены все три аллельных варианта микросателлита *BM224*. Их распределение на ареале оказалось географически детерминированным. Среди диплоидных жаб обнаружено сходство между распределением аллелей микросателлита *BM224* и изменчивостью по количеству ядерной ДНК.

Ключевые слова: микросателлиты, размер генома, количество ядерной ДНК, полиплоидия, *Bufo viridis*, *Bufo oblongus*, *Bufo pewzowi*.

Долгое время считали, что количество ядерной ДНК в клетках (размер генома) у представителей одного и того же вида одинаково и внутривидовой изменчивости практически не существует (Bennet, Smith, 1976). Полагали, что наличие некоторой вариабельности объясняется ошибкой измерений или разного рода методическими проблемами. Принятие этой догмы привело к тому, что при сравнительной оценке размера генома у разных видов использовались лишь единичные экземпляры, место сбора которых даже не указывалось. Однако в ходе изучения больших выборок рядом авторов независимо друг от друга в разных группах позвоночных животных была зарегистрирована значительная внутривидовая изменчивость (Sherwood, Patton, 1982; Borkin et al., 1986; Johnson et al., 1987; Burton et al., 1989; Lockwood et al., 1991a, 1991b; Lockwood, Derr, 1992).

У амфибий внутривидовая изменчивость по количеству ядерной ДНК обычно невысока и составляет 2—3 %, но иногда она достигает 5—17 % (Licht, Lowcock, 1991; Mac Culloch et al., 1996; Murphy et al., 1997; Litvinchuk et al., 1999, 2001, 2004, 2005a, 2005b; Lizana et al., 2000; Литвинчук и др., 2001; Borkin et al., 2001b, 2003, 2004). Анализ географических различий в размере генома показал, что они, как правило, связаны с генетической неоднородностью видов (Litvinchuk et al., 1999, 2004, 2005a, 2005b; Литвинчук и др., 2001; Borkin et al., 2003; Боркин и др., 2004).

Степень генетических различий обычно оценивают с помощью различных кариологических или аллозимных методов, а в последнее время и с помощью методов, анализирующих непосредственно последовательности ДНК. Два первых подхода имеют серьезные ограничения, связанные с необходимостью работы с живыми организмами или свежими тканями. При изучении же последовательностей ДНК можно использовать даже субфоссильные и музейные образцы (Литвинчук и др., 2002). Как правило, ДНК животных анализируется по секвенированным участкам митохондриального генома или по числу сателлитных повторов, локализованных в ядерном геноме. Однако выяснение эволюционно-генетических взаимосвязей между разными популяциями и видами по митохондриальной ДНК имеет ряд недостатков, связанных со сложностями в применении этого метода при наличии межвидовой гибридизации (Litvinchuk et al., 1999; Alves et al., 2001; Evans et al., 2004). Анализ повторов ДНК, как правило, лишен этого недостатка.

В последнее время широкое распространение получили методы анализа микросателлитных повторов с использованием неслучайных праймеров. Микросателлитные локусы характеризуются экстремально высокой скоростью мутаций. Поэтому методы, с помощью которых их изучают, применяются в основном для анализа внутрипопуляционной изменчивости и межпопуляционных взаимоотношений (Scribner, Pearce, 2000; Neff, Gross, 2001; Scribner et al., 2001; Jehle, Arntzen, 2002). У амфибий сейчас найдено достаточно большое количество микросателлитных локусов (Scribner et al., 1994; Arens et al., 2000; Berlin et al., 2000; Garner et al., 2000; Newman, Squire, 2001; Krupa et al., 2002). Однако зеленые жабы комплекса *Bufo viridis* пока остаются практически неи-

зученными. Ближайший родственный вид, для которого были найдены микросателлитные локусы, — это европейская камышовая жаба *B. calamita* (Rowe et al., 1997, 2000). Кроме того, подобные локусы были выявлены у представителей других эволюционных групп широкораспространенного рода *Bufo*: у европейской серой жабы *B. bufo*, а также североамериканской жабы-аги *B. marinus* (Scribner et al., 1994, 1997; Tile et al., 2000). Найденные локусы в большинстве случаев оказались узко специфичными, т. е. либо были мономорфными, либо не амплифицировались при анализе других видов. Однако два из них (*BM224* и *Bcal7*) оказались изменчивыми у ряда видов, включая три вида из комплекса *B. viridis* (Stöck et al., 2002).

В последние десятилетия азиатские зеленые жабы стали объектом пристального внимания. Это связано с обнаружением у них необычного для животных типа видообразования, связанного с полиплоидией (Мазик и др., 1976; Писанец, 1978; Bachmann et al., 1978; Писанец, Щербак, 1979; Крюков и др., 1985; Боркин и др., 1986а, 1986б, Орлова, Утешев, 1986; Borkin et al., 1986, 1995, 2001a; Roth, 1986; Roth, Ráb, 1986; Кудрявцев и др., 1988; Боркин, Соколова, 1989; Межжерин, Писанец, 1990, 1991, 1995а, 1995б; Писанец, Межжерин, 1996; Dujsebayeva et al., 1997, 2004; Stöck, 1997, 1998a, 1998b; Stöck, Grosse, 1997; Castellano et al., 1998, 2000, 2003; Balletto et al., 1999; Stöck et al., 1999, 2001a, 2001b, 2002, 2005; Delpero et al., 2000). Согласно последним представлениям (Stöck et al., 2001b), надвидовой комплекс *B. viridis* состоит из четырех близкородственных видов, распространенных от Северо-Западной Африки до Западного Китая. Бóльшую часть ареала комплекса населяют диплоидные зеленые жабы, представленные одним видом *B. viridis* с несколькими подвидами. На Востоке (Иран, Пакистан, Средняя Азия, Казахстан и Китай) встречаются три полиплоидных вида: жаба Никольского (*B. oblongus*), жаба Певцова (*B. pewzowi*) и пуштунская жаба (*B. pseudoraddei*). Первые два вида — тетраплоиды (ранее объединялись в один вид *B. danatensis*), а третий — единственный среди позвоночных полностью триплоидный обоеполый вид (Писанец, 1978, 1991; Писанец, Щербак, 1979; Stöck et al., 1999, 2001a, 2001b, 2002, 2005). В зонах контакта диплоидных и тетраплоидных видов нередко наблюдаются триплоидные особи (Писанец, 1978; Borkin et al., 2001a).

Целью нашего исследования было изучение изменчивости микросателлитов *BM224* и *Bcal7* в диплоидно-полиплоидном комплексе *B. viridis*, а также сопоставление распределения геномных форм и микросателлитов у полиморфного диплоидного вида *B. viridis*.

Материал и методика

Для исследования изменчивости микросателлитных локусов *BM224* и *Bcal7* нами было обработано 125 образцов (табл. 1; рис. 1). Среди них 25 образцов были заспиртованными музейными экземплярами (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург) возрастом до 29 лет. Остальные 100 образцов были представлены свежими пробами мышц и крови, которые до проведения исследований хранились замороженными (–20 °C). Перед процедурой выделения ДНК ткани, хранившиеся в спирте, лиофилизировали в центрифужно-вакуумном испарителе. Навески тканей (0.1—5.0 г) помещали в фарфоровую ступку и заливали жидким азотом. Материал истирали до порошкообразного состояния, затем переносили в пробирку Эппендорфа. К пробе добавляли 1 мл лизирующего буфера, содержащего 0.15 мг/мл протеиназы K, 0.1 M NaCl, 20 мМ ЭДТА, 1 % додецилсульфата натрия и 50 мМ Трис-HCl. Полученную смесь инкубировали 24 ч при 37 °C. После инкубации из лизата выделяли ДНК стандартным фенол-хлороформным методом с последующим осаждением этиловым спиртом. Осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в буфере ТЕ (10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 1 мМ ЭДТА, pH 8).

Микросателлитные локусы *BM224* и *Bcal7* были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Микросателлитный локус *BM224* представляет собой последовательность $(TG)_5TA(TG)_5TA(TG)_2\ldots(AG)_{15}$. В качестве праймеров использовали следующие олигонуклеотидные последовательности: прямой праймер 5′-GGGATCTGTGCAGATGGG-3′ и обратный 5′-GCTGATCTTGCACAATCTTTG-3′ (Tikel et al., 2000). Микросателлитный локус *Bcal7* представляет собой последовательность $(GA)_n$ длиной около 140 пар нуклеотидов (п. н.). Использовали прямой праймер 5′-GCCCATACTGCCCAAATCTCC-3′ и обратный 5′-GCAGGCTGCCATTTTTTTCG-3′ (Rowe et al., 1997).

Реакционная смесь содержала 0.2 мМ каждого dNTP, буфер для Taq-полимеразы (67 мМ трис-HCl, pH 8.3, 17 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 % Tween 20, 0.12 мг/мл БСА и 8 % глицерина), по 0.25 мМ прямого и обратного праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы и 1.5 мкг ДНК. Реакцию проводили в тонкостенных микропробирках объемом 0.2 мл под слоем вазелинового масла.

Амплификацию локуса *BM224* проводили в следующем режиме: (94 °C — 105 с) + (94 °C — 15 с, 57 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + (94 °C — 15 с, 56 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + (94 °C — 15 с, 55 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + + (94 °C — 15 с, 54 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + (94 °C — 15 с, 53 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + (94 °C — 15 с, 52 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) + (94 °C — 15 с, 57 °C — 20 с, 72 °C — 10 с) × 27 + (72 °C — 120 с).

Локус *Bcal7* амплифицировали при следующем режиме: (94 °C — 60 с) + (94 °C — 60 с, 66 °C — 60 с, 72 °C — 60 с) × 2 + (94 °C — 60 с, 60 °C — 60 с, 72° C — 60 с) × 2 + (94 °C — 60 с, 62 °C — 60 с, 72 °C — 60 с) × 2 + + (94 °C — 60 с, 60 °C — 60 с, 72 °C — 60 с) × 2 + (94 °C — 60 с, 58 °C — 60 с, 72 °C — 60 с) × 21.

Продукты реакций разделяли методом гель-электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле. По окончании электрофореза фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом излучении трансиллюминатора после окраски геля бромистым этидием.

Для оценки уровня плоидности в популяциях видов комплекса *B. viridis* в подавляющем большинстве случаев использовали проточную ДНК-цитометрию. Лишь плоидность одной триплоидной особи *B. oblongus* из Туркменистана оценивали подсчетом количества хромосом на метафазных пластинках (Borkin et al., 1986). Изменчивость размера генома была изучена у 1057 постметаморфозных особей из 220 выборок. После анестезии кровь забирали непосредственно из сердца. Тестируемые клетки смешивали с клетками репера (эритроциты травяных лягушек *Rana temporaria*, собранных в Ленинградской и Псковской областях) и анализировали совместно. В такой смеси и изучаемые клетки, и клетки репера красили и измеряли в одних и тех же условиях.

Таблица 1

Распределение аллелей микросателлитного локуса *BM224* в 53 выборках трех видов зеленых жаб комплекса *Bufo viridis*

Номер выборки	Место сбора	Координаты		Количество особей	Встречаемость аллелей *BM224*, %		
		долгота	широта		*a*	*b*	*c*
	Диплоидные популяции (*B. viridis*)						
	Северная Африка						
1	Айн-Драхам (Тунис)	36°46′	8°41′	1		100	
2	Сус (Тунис)	35°52′	10°36′	13	12	62	27
3	Оазис Дуз (Тунис)	33°27′	9°01′	3		33	67
	Восточная Европа (*B. viridis viridis*)						
4	Банатска Паланка (Сербия и Черногория)	44°51′	21°20′	1			100
5	Синая (Румыния)	45°21′	25°33′	1			100
6	Витебск (Белоруссия)	55°13′	30°16′	1			100
7	Балаклава (Крым, Украина)	44°30′	33°37′	1			100
8	Морское (Крым, Украина)	44°50′	34°48′	1			100
9	Веселое (Харьковская обл., Украина)	49°24′	37°11′	1			100
10	Мамелаево (Мордовия, Россия)	54°17′	44°03′	1			100
11	Горенка (Мордовия, Россия)	53°51′	42°54′	2			100
12	Котрокс (Мордовия, Россия)	54°17′	44°03′	2			100
13	Саранск (Мордовия, Россия)	54°11′	45°10′	1			100
14	Старая Авгура (Мордовия, Россия)	54°17′	44°13′	3			100
15	Большое Мересево (Мордовия, Россия)	54°18′	46°36′	1			100
16	Ижевск (Удмуртия, Россия)	56°50′	53°12′	1			100
	Северный Дагестан						
17	Южно-Сухокумск (Дагестан, Россия)	44°42′	45°27′	7	14	14	72
	Северо-Западный Казахстан						
18	Переметное	51°12′	50°49′	10	65	30	5
	Нижнее Поволжье						
19	Андреевка (Оренбургская обл., Россия)	52°19′	51°54′	1	50		50
20	Гора Тримор (Саратовская обл., Россия)	51°19′	50°07′	1		50	50
21	Гора Большое Богдо (Астраханская обл., Россия)	48°10′	46°49′	10	25	45	30
	Восточный Кавказ и Северо-Западный Иран						
22	Тынди (Дагестан, Россия)	42°19′	45°49′	5		100	
23	Куруш (Дагестан, Россия)	41°17′	47°50′	6		100	
24	Бешта (Дагестан, Россия)	42°08′	46°09′	3	50	50	
25	Ереван (Армения)	40°12′	44°32′	6		100	
26	Ущелье Нораванк (Армения)	40°45′	44°24′	1	100		
27	Оранд (Азербайджан)	38°45′	48°19′	1		100	
28	Занджан (Иран)	36°39′	48°28′	1		100	
	Юго-Западный Иран и Средиземноморское побережье Турции («*B. viridis arabicus*»)						
29	Персеполис (Иран)	29°56′	52°53′	1		100	
30	Алтынозю (Турция)	36°07′	36°15′	2		100	
31	Газипаша (Турция)	36°14′	32°31′	5		100	
32	Сиде (Турция)	36°46′	31°28′	1		100	
33	Хурма (Турция)	36°50′	30°34′	1		100	
	Эгейское побережье анатолийской Турции						
34	Менемен (Турция)	38°37′	27°05′	1		100	

Таблица 1 (*продолжение*)

	Центральный Иран (*B. viridis kermanensis*)						
35	Сардуйе (Иран)	29°02′	57°54′	1	50	50	
	Бассейн р. Амударья (*B. viridis turanensis*)						
36	Тигровая балка (Таджикистан)	37°10′	68°03′	1		100	
37	Катта-Кумские пески (Узбекистан)	37°22′	67°19′	2		100	
	Южный Туркменистан						
38	Кара-Кала	38°26′	56°17′	1	100		
39	Ущелье Чандыра (Кара-Калинский р-н)	38°26′	56°17′	2	25	75	
	Бассейн р. Сырдарья						
40	Новоказалинск (Казахстан)	45°49′	62°08′	1			100
	Юго-Западная Сибирь						
41	Новосибирск (Россия)	54°59′	83°01′	1			100
	Триплоидные выборки						
	Южный Туркменистан						
42	Даната (Туркменистан)	39°06′	55°06′	1	100		
	Юго-Восточный Казахстан						
43	Капчагай	43°54′	77°09′	1		100	
44	Отар	44°25′	75°13′	1		100	
	Памир						
45	Лянгар (Нагорный Бадахшан, Таджикистан)	37°03′	72°39′	2		100	
	Тетраплоидные выборки						
	Южный Туркменистан (*B. oblongus*)						
46	Ай-Дере (Туркменистан)	38°24′	56°45′	2	100		
	Тянь-Шань и Алтай (*B. pewzowi*)						
47	Оазис Яман-Ус (Западная Монголия)	46°13′	91°27′	1		100	
48	Оз. Алаколь (Юго-Восточный Казахстан)	46°22′	81°58′	3		100	
49	Капчагай (Юго-Восточный Казахстан)	43°54′	77°09′	1		100	
50	Р. Алабуга (Кыргызстан)	41°25′	74°42′	1			100
51	Хребет Нуратау (Узбекистан)	40°35′	66°30′	2		100	
52	Ущелье Келиф-Шерабадское	37°59′	66°40′	3		100	
53	Р. Кафирниган (Таджикистан)	37°53′	68°15′	1		100	

Взвесь клеточных образцов была получена с использованием фосфатного буфера, содержащего 0.7 мМ ЭДТА (pH 7.5). Общая концентрация клеток во взвеси составляла примерно 10^6 кл./мл. Клетки были обработаны Тритоном X-100 (Ferak, Berlin) в конечной концентрации 0.1 % и окрашены оливомицином (ОМ) и этидиум бромидом (ЭБ) в конечных концентрациях 40 и 20 мкг/мл соответственно в присутствии 15 мМ $MgCl_2$. Окрашенные клетки изучали спустя 24 ч хранения при 4° С.

Проточную ДНК-цитометрию проводили, используя лабораторную модель проточного цитометра на ртутной лампе, созданную на основе микроскопа ЛЮМАМ и сконструированную в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург). Условия возбуждения флуоресценции и регистрации сигналов оптимизировали для каждого варианта окрашивания. Гистограммы ДНК были получены с помощью многоканального анализатора, соединенного с микрокомпьютером. Скорость анализа была около 100—200 кл./с. Каждый образец анализировали 4 раза. Количество измеряемых клеток в каждой повторности составляло около 10 000. Нормальность распределения пиков ДНК-гистограмм оценивали с помощью метода наименьших квадратов. Коэффициенты вариации этих ДНК-гистограмм были около 2.0 %. Размер генома для каждой особи (в отн. ед.) определяли как отношение среднего значения его клеточного пика к таковому у *R. temporaria*.

Для того чтобы перевести размер генома из отн. ед. в абсолютные, выраженные в пг, необходимо иметь данные о размере генома у эритроцитов реперного вида. Такие данные можно получить, только используя биохимический анализ или ультрафиолетовую цитометрию. К сожалению, имеющиеся данные, полученные разными авторами, часто не совпадают. В этой работе мы исполь-

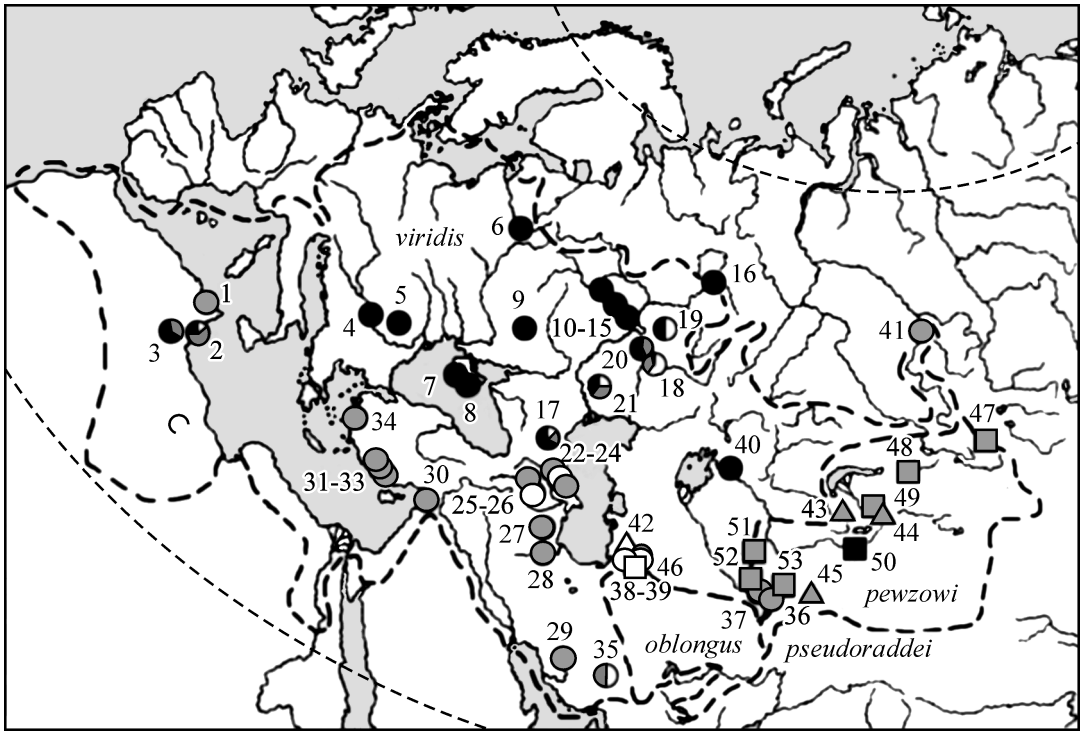

Рис. 1. Распределение аллелей микросателлита *BM224* в популяциях *Bufo viridis*, *B. oblongus* и *B. pewzowi.*

Белый значок — встречаемость аллеля *a*, *серый* — *b*, *черный* — *c*. *Кружки* — места сбора диплоидов, *треугольники* — триплоидов, *квадраты* — тетраплоидов. *Жирной штриховой линией* обозначены примерные границы распространения видов. *Цифры* соответствуют номерам выборок в табл. 1.

Fig. 1. Distribution of microsatellite *BM224* in populations of three species of the *Bufo viridis* complex.

Frequencies of alleles: *a* — open symbols, *b* — grey symbols, *c* — black symbols. *Circles* — diploids, *triangles* — triploids, and *squares* — tetraploids.

зовали размер генома *R. temporaria* как базовую единицу и считали, что количество ядерной ДНК у этого вида равно 10.32 пг (Borkin et al., 2001b). Для того чтобы получить данные о размере генома у изучаемых жаб в абсолютных единицах, смесь эритроцитов жаб и *R. temporaria* анализировали также после окрашивания с ЭБ. Смесь клеток окрашивали после добавления в нее Тритона X-100, ЭБ и $MgCl_2$ в конечных концентрациях около 0.1 %, 20 мкг/мл и 15 мМ соответственно. Окрашенные образцы измеряли через 4—6 ч хранения при 4° С. Некоторые другие детали этого метода были описаны ранее (Vinogradov et al., 1990; Розанов, Виноградов, 1998). Относительные различия между размерами генома (*RD*) рассчитывали по формуле $RD = |(X_1 - X_2)/ (X_1 + X_2)| \cdot 200\ \%$, где X_1 и X_2 — средние значения размера генома для каждой из двух сравниваемых выборок.

В настоящей работе мы использовали латинские названия зеленых жаб, предложенные в результате последней таксономической ревизии (Stöck et al., 2001b). Для удобства анализа географически близкие выборки были объединены в рамках определенных географических регионов (табл. 1, 2)

Результаты

Исследования показали, что у всех изученных диплоидных и полиплоидных особей локус *Bcal7* оказался полностью мономорфным. В отличие от него другой микросателлит (*BM224*) в различных популяциях видов комплекса *B. viridis* имел несколько дискретных полос (рис. 2). Мы идентифицировали нижний ряд мажорных полос (рис. 2) как относящийся к локусу *BM224*, имеющему три аллеля. Аллели были обозначены буквами в последовательности от максимально к минимально удаленному от линии старта (*a*, *b* и *c*). Аллель *a* имел длину около 135 п. н., *b* — около 145 и *c* — около 155 п. н. Все остальные более высокомолекулярные фрагменты ДНК, вероятно, амплифицировались в результате неспецифической инициации ПЦР. Мы относили их к другим микросателлитным локусам, изменчивость которых не рассматривали в рамках настоящего исследования.

В табл. 1 и 2, а также на рис. 1 представлено распределение аллелей локуса *BM224* в популяциях видов комплекса *B. viridis*. Обнаружено, что некоторые географические группы популяций обладают только одним из трех найденных аллелей. Выборки из восточной Европы (4—16), относимые к номинативному подвиду *B. v. viridis*, характеризовались только аллелем *c*.

Только один аллель *b* был найден в диплоидных популяциях из Турции (30—34), Юго-Западного Ирана (29), Западной Сибири (41), а также из восточной части бассейна р. Амударья (36—37: Южный Узбекистан и Таджикистан). Помимо этого, данный алель был выявлен у всех тетраплоидных жаб *B. pewzowi*, обитающих в горных системах Тянь-Шаня и Алтая, а также в примыкающих к ним низинных территориях (47—49 и 51—53). Исключение составила лишь одна тетраплоидная жаба из Центрального Тянь-Шаня (р. Ала-Буга, Кыргызстан), которая имела аллель *c*. У триплоидных жаб из трех вы-

Таблица 2

Вариабельность размера генома и микросателлита *BM224* в некоторых географических группах видов комплекса *Bufo viridis*

Регион	Количество особей; количество мест сбора	Размер генома, пг[a]	Количество особей	*BM224*	
				аллели и их частота, %	*H*[б]
Диплоидные выборки					
Центральный Иран	2; 1	9.14 (9.12—9.15)	1	*a*-50, *b*-50	1.00
Юго-Западный Иран и Средиземноморское побережье Турции	14; 7	9.15 ± 0.03 (9.09—9.21)	9	*b*-100	0
Юго-Западная Сибирь	3; 1	9.19 ± 0.06 (9.15—9.25)	1	*b*-100	0
Восточный Кавказ и Северо-Западный Иран	131; 35	9.23 ± 0.08 (9.03—9.39)	23	*a*-11, *b*-89	0.04
Северо-Западный Казахстан	18; 6	9.26 ± 0.05 (9.17—9.36)	10	*a*-65, *b*-30, *c* = 5	0.60
Эгейское побережье анатолийской Турции	16; 3	9.29 ± 0.04 (9.23—9.36)	1	*b*-100	0
Южный Туркменистан и о-в Барса-Кельмес (Аральское море)	41; 8	9.31 ± 0.05 (9.23—9.39)	3	*a*-50, *b*-50	1.00
Нижнее Поволжье, Калмыкия и Кабардино-Балкария	100; 24	9.36 ± 0.06 (9.14—9.50)	12	*a*-25, *b*-42, *c*-33	0.58
Северный Дагестан	7; 1	9.45 ± 0.04 (9.42—9.53)	7	*a*-14, *b*-14, *c*-72	0.57
Восточная Европа[b]	254; 55	9.56 ± 0.07 (8.93—9.71)	24	*c*-100	0
Бассейны рек Сырдарья, Чу и Или	147; 15	9.60 ± 0.05 (9.44—9.81)	1	*c*-100	0
Северо-Западная Африка (Тунис)	27; 3	9.79 ± 0.07 (9.66—9.90)	17	*a*-9, *b*-59, *c*-32	0.59
Бассейн р. Амударья	11; 3	9.82 ± 0.07 (9.70—9.93)	4	*b*-100	0
Триплоидные выборки					
Южный Туркменистан	—	—	1	*a*-100	0
Юго-Восточный Казахстан	14; 4	14.75 ± 0.11 (14.62—14.94)	3	*b*-100	0
Памир	4; 1	15.64 ± 0.16 (15.49—15.86)	2	*b*-100	0
Тетраплоидные выборки					
Южный Туркменистан	2; 2	19.01 (18.92—19.11)	2	*a*-100	0
Тянь-Шань и Монголия	265; 51	19.87 ± 0.27 (19.29—20.57)	11	*b*-91, *c*-9	0

[a] Средние значения ± стандартное отклонение, в скобках приведен размах значений. [б] *H* — наблюдаемая гетерозиготность микросателлита *BM223*. [b] Включены две особи из района античного города Троя в анатолийской Турции.

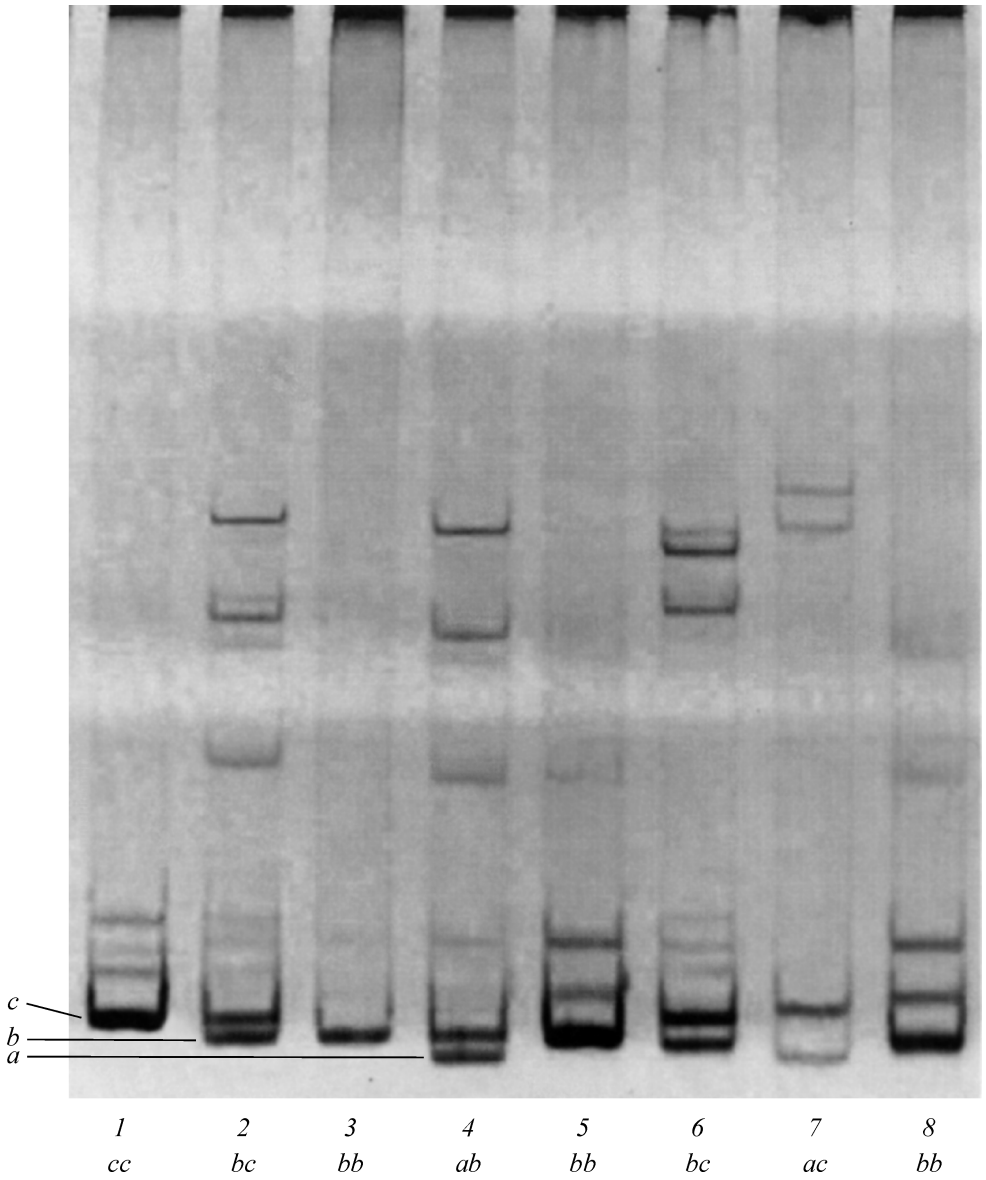

Рис. 2. Результаты разделения аллелей микросателлита *BM224* методом гель-электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле с использованием буфера ТБЕ (негатив изображения).

Места сбора животных: *1* — с. Старая Авгура, Россия; *2* — оазис Дуз, Тунис; *3*, *4*, *6*, *7* — гора Богдо, Россия; *5* — Айн-Драхам, Тунис; *8* — с. Алтынозю, Турция. *Строка внизу* — результаты расшифровки аллельных вариантов.

Fig. 2. Results of separation of microsatellite *BM224* alleles in 12 % PAAG.

1 — settlement Staraya Avgura, Russia; *2* — the Duz oasis, Tunisia; *3*, *4*, *6*, *7* — the Bol'shoe Bogdo hill, Russia; 5 — settlement Ain-Draham, Tunisia; *8* — village Altynozü, Turkey. Results of interpretation of allele variants are given bellow.

борок из Юго-Восточного Казахстана и Памира (43—45) также был найден только аллель *b*.

Только аллель *a* был обнаружен на юге Туркменистана (хребет Копетдаг) у двух тетраплоидных особей *B. oblongus* (46), а также у триплоидной жабы из этого же региона (42).

Выборки из других географических регионов содержали более одного аллеля. Диплоидные жабы из Туниса (1—3), Северного Дагестана (17), Нижнего Поволжья (19—21) и Северо-Западного Казахстана (18) обладали всеми тремя аллелями. В отличие от них другие диплоидные выборки из восточной части Кавказа и прилегающей части Северо-Западного Ирана (22—28), из центрального Ирана (35), а также из Южного Туркменистана (38—39) характеризовались только двумя аллелями *a* и *b*.

По распределению количества ядерной ДНК у видов диплоидно-полиплоидного комплекса *B. viridis* нами выявлены три хорошо обособленных пика, которые соответствовали разным уровням плоидности (рис. 3). Первый пик с наименьшими значениями размера генома соответствует диплоидным особям *B. viridis*, второй, со средним количеством ядерной ДНК, — триплоидным, а третий, с самым большим геномом, — тетраплоидам *B. pewzowi* и *B. oblongus*.

На гистограммах (рис. 4), показывающих распределение размера генома у диплоидного вида *B. viridis*, видны два хорошо различимых пика. Средние различия

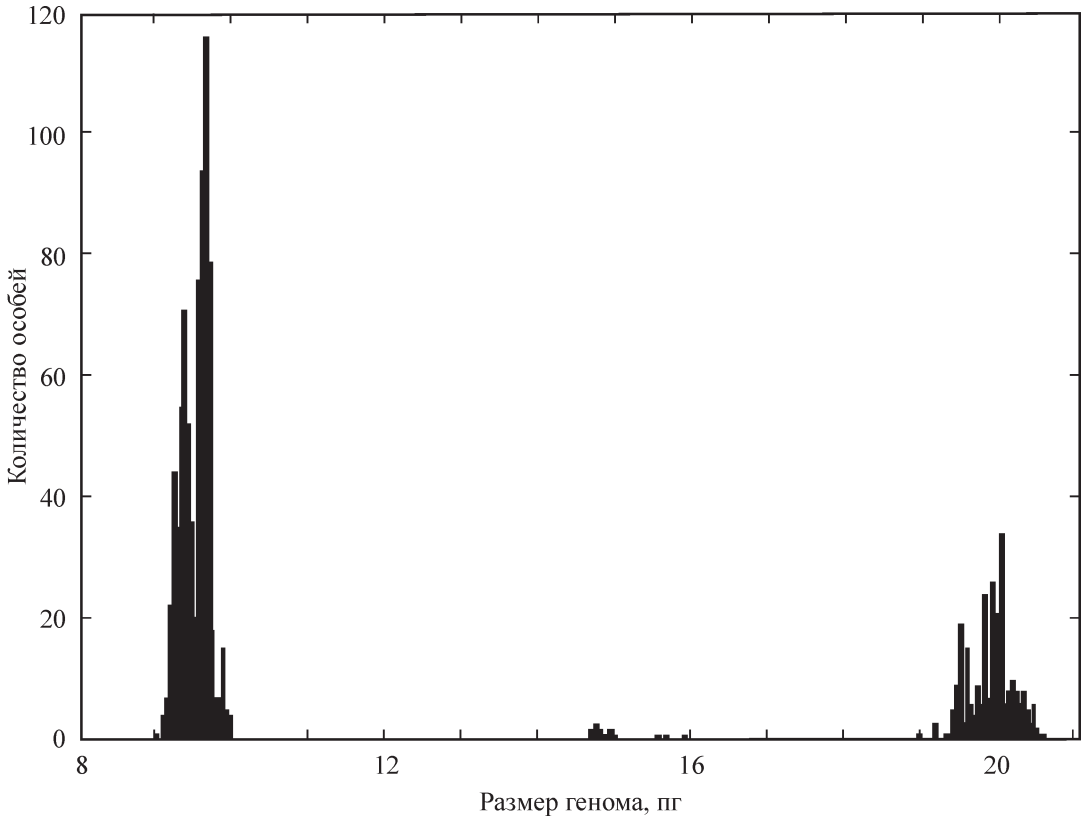

Рис. 3. Распределение размера генома в диплоидно-полиплоидном комплексе *Bufo viridis*.

Fig. 3. Distribution of genome size (picograms) in the *Bufo viridis* diploid-polyploid complex.

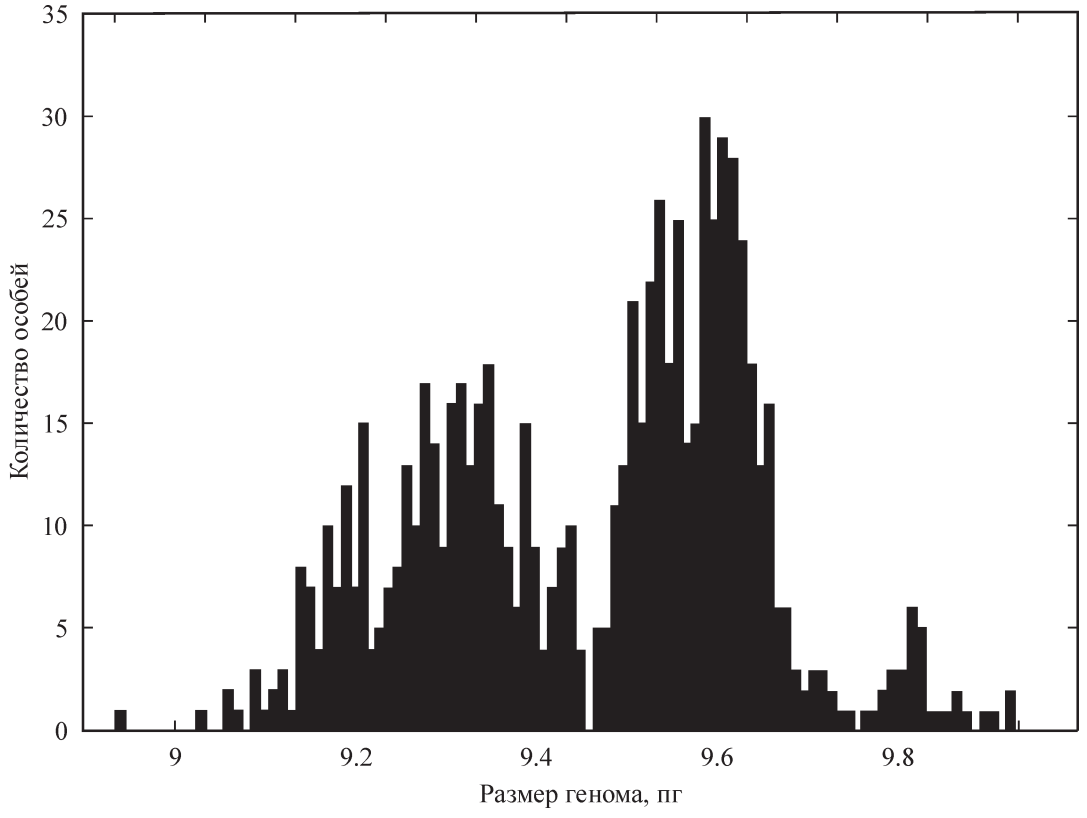

Рис. 4. Распределение размера генома у диплоидного вида *Bufo viridis*.

Fig. 4. Distribution of genome size (picograms) in the diploid species *Bufo viridis*.

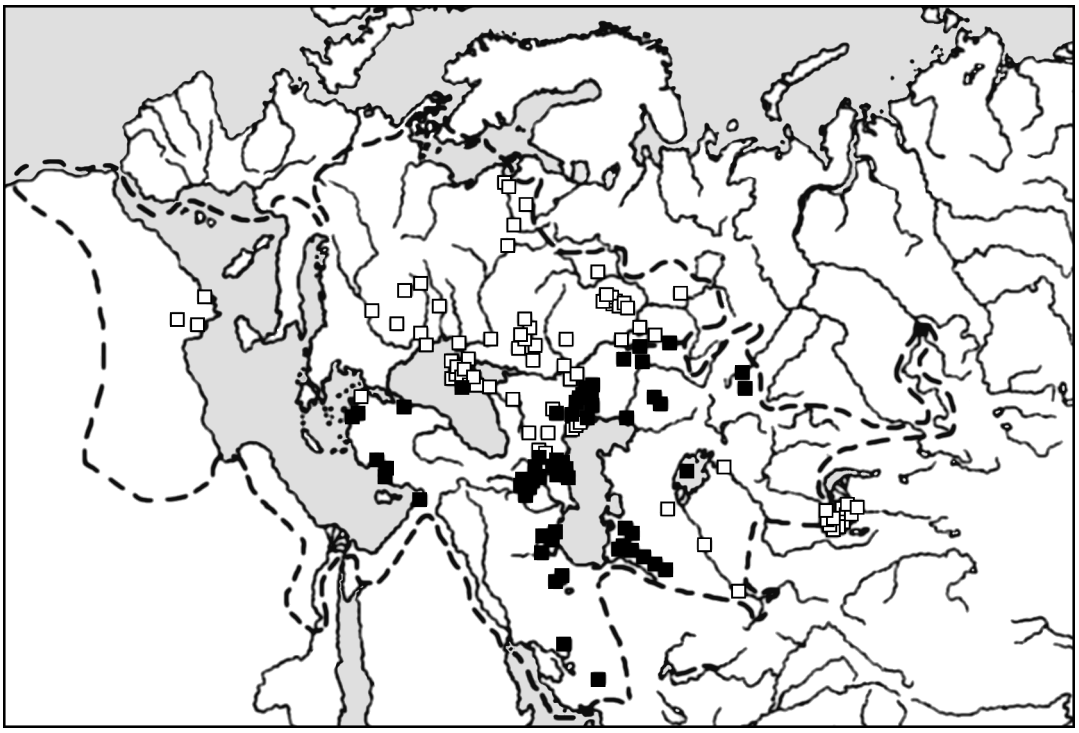

Рис. 5. Географическое распространение популяций *Bufo viridis* со средним размером генома более (*белые квадраты*) и менее (*черные квадраты*) 9.40 пг.

Fig. 5. Geographic distribution of *Bufo viridis* populations with average genome size more than 9.40 picograms (*open squares*), less than 9.40 picograms (*black squares*).

(*RD*) между ними составляли около 3.7 %. Первый пик формировали выборки с низкими значениями размера генома. Среди них наименьшее количество ядерной ДНК (в среднем 9.14—9.15 пг при размахе значений 9.09—9.21 пг) имели особи из Ирана и Средиземноморского побережья Турции (табл. 2; рис. 5). Несколько бóльшие геномы (9.23—9.31 пг; размах значений 9.03—9.39 пг) были отмечены у зеленых жаб из Эгейского побережья анатолийской Турции, Северо-Западного Казахстана, Западной Сибири, Восточной части Кавказа, Северо-Западного Ирана, а также из Юго-Западного Туркменистана (рис. 5). Второй пик (рис. 4) составили выборки диплоидной *B. viridis* с более крупными значениями размера генома. Среди них выборки из бассейнов рек Сырдарья, Или и Чу, а также из Восточной Европы имели чуть меньше ядерной ДНК (9.56—9.60 пг; размах значений 9.40—9.81 пг, за исключением трех особей с южного берега Крыма) по сравнению с выборками из бассейна р. Амударья и Северной Африки (9.79—9.82 пг; размах значений 9.66—9.93 пг).

Часть выборок, собранных на границах распространения разных геномных групп, имела промежуточные средние значения размера генома (9.36—9.45 пг; размах значений 9.14—9.53 пг). Такие выборки найдены на севере Дагестана, в Нижнем Поволжье, Восточной Калмыкии и Кабардино-Балкарии (табл. 2).

Сопоставление географии распределения аллелей микросателлита *BM224* и размера генома в пределах диплоидного вида *B. viridis* показало наличие связи между ними. Все группы, имевшие небольшое количество ядерной ДНК, характеризовались наличием только аллелей *a* и *b*. Исключение составили выборки, собранные в местах контакта с европейской *B. viridis*. Здесь были обнаружены особи с аллелем *c*, находящимся, как правило, в гетерозиготном состоянии (табл. 2). Выборки с бóльшими геномами имели различное распределение аллелей микросателлита *BM224* (рис. 1, 5). Так, зеленые жабы из Восточной Европы и бассейна р. Сырдарья характеризовались только одним аллелем *c*. Зато североафриканские *B. viridis* несли все три аллельных варианта, а выборки из бассейна р. Амударья характеризовались наличием только одного аллеля *b*.

Обсуждение

Сателлитная ДНК обычно содержит большое количество тандемно повторяющихся последовательностей, конкретная роль которых в эукариотическом геноме до сих остается неясной. В последнее время появилось немало работ, свидетельствующих о взаимной связи между дивергенцией сателлитной ДНК и дивергенцией видов. С другой стороны, в микроэволюционных исследованиях все чаще стал использоваться такой генеральный параметр, как количество ядерной ДНК. Связано это с тем, что внутривидовая изменчивость по данному признаку была обнаружена в разных классах позвоночных животных (см. выше). Географическая изменчивость размера генома ранее неоднократно отмечалась и для ряда видов амфибий (Mazin, Borkin, 1979; Borkin et al., 1986; Licht, Lowcock, 1991; Murphy et al., 1997; Litvinchuk et al., 1999, 2004, 2005a, 2005b). Кроме того, на примере хвостатых амфибий было показано, что степень различий между размерами генома увеличивается в соответствии с уровнем дивергенции между разны-

ми популяциями и видами, выраженным в таксономических рангах (Литвинчук и др., 2001).

Среди амфибий внутривидовые различия по количеству ядерной ДНК в среднем обычно не превышают 3 % (Litvinchuk et al., 2004). Однако в ряде случаев были выявлены и более заметные различия (табл. 3). У таких видов средние различия между внутривидовыми геномными группировками варьировали от 3.2 до 8.8 %. Генетические дистанции (D_{Nei}, аллозимы) между ними, как правило, были около 0.2 и выше, что соответствует нижнему пределу межвидовых различий (Халтурин и др., 2003; Litvinchuk et al., 2005b).

Среди диплоидных зеленых жаб наибольшие различия по размеру генома (*RD* = 7.2 %) были найдены между *B. viridis kermanensis* из Центрального Ирана, с одной стороны, и выборками *B. viridis turanensis* из бассейна р. Амударья — с другой (табл. 2). Таким образом, можно утверждать, что внутривидовая изменчивость размера генома у *B. viridis* превышает обычный для амфибий уровень вариабельности.

Проведенные ранее аллозимные исследования показали, что уровень генетических различий между популяциями диплоидной *B. viridis* из Восточной Европы, Восточного Кавказа, Южного Туркменистана и бассейна р. Или (Юго-Восточный Казахстан), с одной стороны, значительно ниже, чем между ними и жабами из бассейна р. Амударья (Юго-Западный Таджикистан) — с другой (Межжерин, Писанец, 1990, 1991, 1996б). Различия оказались столь высокими (средние значения D_{Nei} равны 0.25—0.29), что эти авторы сочли возможным описать амударьинскую форму в качестве отдельного вида *B. shaartusiensis* (Писанец, Межжерин, 1996). В другом исследовании (Balletto et al., 1999) были показаны значительные различия между европейскими и южно-казахстанскими выборками *B. viridis*. Кроме того, среди европейских зеленых жаб итальянские выборки резко отличались от всех остальных, что подтверждалось и морфологическими исследованиями. Секвенирование контрольного региона митохондриального генома (Stöck et al., 2005) показало наличие трех резко отличающихся друг от друга линий диплоидных зеленых жаб. В первую из них вошли выборки *B. viridis* из Европы и Центрального Ирана, во вторую — из Южного Туркменистана и прилегающей части Северо-Восточного Ирана, а в третью — из бассейна р. Чу. Таким образом, в этих исследованиях был показан высокий уровень генетических различий между среднеазиатскими формами и европейско-переднеазиатскими зелеными жабами. Кроме того, обнаружен высокий уровень гетерогенности и среди *B. viridis* из Средней Азии.

Наши данные по изменчивости размера генома и микросателлита *BM224*, а также молекулярно-генетические данные прежних авторов в совокупности позволяют наметить три географические группировки диплоидных зеленых жаб, распространенных на территории Средней Азии. Распространение этих групп можно связать со следующими географическими районами: 1) Южный и Западный Туркменистан, а также Западное Приаралье (с некоторыми островами Аральского моря); 2) бассейн р. Амударья; 3) бассейны рек Сырдарья, Чу и Или.

Как упоминалось ранее, наиболее сильные генетические (аллозимные) отличия от других среднеазиатских групп были отмечены для амударьинской формы *B. viridis* (Межжерин, Писанец, 1990, 1991, 1995б), характеризовавшейся наибольшим геномом и наличием только одного аллеля *b* по микросателлиту *BM224*.

Таблица 3

Виды амфибий, для которых найдены значительные внутривидовые различия по размеру генома

Вид	RD, %	D_{Nei}[а]	Литературный источник
Pelobates fuscus	5.8	0.31	Халтурин и др., 2003; Borkin et al., 2003
Bombina variegata	5.0	0.08	Borkin et al., 2005
Salamandrella keyserlingii	3.2	0.70	Litvinchuk et al., 2004
Triturus karelinii	6.3	0.21	Litvinchuk et al., 1999
T. ophryticus	7.0	0.38	Litvinchuk et al., 2005a, 2005b
T. vulgaris[б]	8.8	0.17	Боркин и др., 2004; Litvinchuk et al., 2005a

[а] D_{Nei} — генетическая дистанция по Нею (аллозимные данные).
[б] Имеются в виду *Trituris vulgaris* и *T. vulgaris lantzi.*

Большое сходство по размеру генома обнаруживается между выборками из бассейнов рек Сырдарья, Чу и Или. Это, возможно, говорит о том, что в плейстоцене эти реки могли быть объединенными в единую речную систему. Любопытно, что все эти жабы по размеру генома (большие геномы) и микросателлиту *BM224* (аллель *c*) оказались наиболее сходными с европейскими диплоидными выборками. Однако аллозимные исследования (Balletto et al., 1999) и анализ последовательностей митохондриальной ДНК (Stöck et al., 2005) показали высокий уровень обособленности европейских популяций, образующих свой кластер. Таким образом, этот вопрос требует своего дальнейшего изучения на большем материале и, возможно, с применением других методов.

Наиболее близкими к южно-туркменской форме зеленых жаб по размеру генома (меньший геном) и микросателлиту *BM224* (аллели *a* и *b*) были выборки *B. viridis* из Передней Азии (*B. viridis kermanensis* и подвид без названия, который ранее назывался *B. viridis arabicus*), восточной части Кавказа и Северо-Западного Казахстана. Однако изучение последовательностей митохондриальной ДНК (Stöck et al., 2005) показало, что жабы из южного Туркменистана и Северо-Восточного Ирана, с одной стороны, и *B. viridis kermanensis* из Центрального Ирана — с другой — относятся к различным филогенетическим ветвям.

Выявлены явные различия по размеру генома и микросателлиту *BM224* между восточноевропейской *B. v. viridis*, с одной стороны, а также переднеазиатскими *B. viridis kermanensis* и *B. viridis arabicus* — с другой. Однако по этим же признакам зеленые жабы из Восточного Кавказа и Северо-Западного Казахстана оказались наиболее близки к переднеазиатским *B. viridis arabicus*. Мы склонны обособить зеленых жаб из Северного Казахстана в отдельный подвид *B. viridis sitibundus* (Pallas, 1771). По-видимому, к нему следует относить и жаб из восточной части Кавказа (Дагестан, Азербайджан, прилегающая часть Ирана и, возможно, Армения и Восточная Грузия). Пониженное количество ядерной ДНК и наличие аллеля *b* по микросателлиту *BM224* у особей *B. viridis* из окр. г. Новосибирска (табл. 2) также позволяют говорить о принадлежности этой выборки к *B. viridis sitibundus*. Судя по имеющимся у нас данным, зона контакта между

этим подвидом и европейской *B. v. viridis* проходит по Кабардино-Балкарии, Северному Дагестану, Калмыкии, Астраханской, Саратовской и Самарской областям. Именно здесь зеленые жабы по локусу *BM224* характеризовались повышенным числом «чужих» аллелей в гетерозиготном состоянии, а по размеру генома — промежуточными значениями (табл. 2). По молекулярно-генетическим данным (Dujsebaeva et al., 2004), зона контакта между *B. viridis sitibundus* и сырдарьинской формой находится на севере и северо-востоке Приаральского региона Казахстана. Южные границы распространения *B. viridis sitibundus* в Передней Азии и его филогенетические взаимоотношения с южно-туркменской формой и переднеазиатской *B. viridis arabicus* нуждаются в дополнительном изучении.

Промежуточные значения по количеству ядерной ДНК нами были отмечены в некоторых выборках из Западной Турции (Измир, Менемен, Адапазари), что указывает на существование в этом регионе переходной зоны между переднеазиатской «*B. viridis arabicus*» и европейской *B. viridis viridis* (судя по размеру генома, последняя встречается в окрестностях античного города Троя).

Кроме того, наши исследования позволили обнаружить значительные различия между *B. viridis* из Европы и Северо-Западной Африки (Тунис). Эти данные подтверждают высказывавшуюся ранее точку зрения (Borkin, 1999) о том, что африканские зеленые жабы могут относиться к отдельному подвиду *B. viridis boulengeri*. Наличие у этого подвида всех трех аллельных вариантов локуса *BM224* может говорить о том, что он возник либо в результате гибридизации европейских и переднеазиатских форм, либо является их непосредственным предком.

Ранее большое внимание уделялось происхождению полиплоидных форм зеленых жаб. К сожалению, единого мнения по этой важной проблеме достичь не удалось, и в литературе, подчас даже в работах одного и того же автора, можно найти аргументацию в пользу как авто-, так и аллополиплоидии (например: Писанец, 1978, 1991; Боркин и др., 1986б; Roth, 1986; Roth, Rab, 1986; Кудрявцев и др., 1988; Межжерин, Писанец, 1990, 1991, 1995а, 1995б; Balletto et al., 1999). Судя по биохимическим (аллозимным) данным и кариологии, тетраплоидные популяции, относимые сейчас к *B. pewzowi*, скорее всего являются автополиплоидами (Боркин, Соколова, 1989; Stöck et al., 2005). Генетически они наиболее близки к диплоидам из бассейна р. Амударья, с одной стороны, или бассейна рек Сырдарья, Чу и Или — с другой (Межжерин, Писанец, 1990, 1991, 1995б; Balletto et al., 1999). Полиплоидные популяции *B. oblongus* из Ирана и Южного Туркменистана, вероятно, являются аллополиплоидами (Stöck et al., 2005). Секвенирование митохондриального генома и анализ аллозимов показали, что тетраплоидные популяции, относимые сейчас к *B. oblongus*, наиболее близки как к диплоидной *B. viridis* из бассейна р. Амударья, так и к диплоидам из Южного Туркменистана (Межжерин, Писанец, 1990, 1995б; Stöck et al., 2005).

Наши исследования по изменчивости микросателлита *BM224* продемонстрировали фиксированные различия по частотам аллелей между двумя тетраплоидными видами *B. oblongus* и *B. pewzowi* (табл. 1, 2). Оба вида характеризовались различными аллельными вариантами в гомозиготном состоянии. Находка особи *B. pewzowi* (р. Алабуга, Тянь-Шань, Кыргызстан), имеющей аллель *c*, а не *b*, как все остальные жабы этого вида, может говорить о происхождении этих тетраплоидов от различных диплоидных групп.

Происхождение триплоидных особей в зонах совместного обитания диплоидных и тетраплоидных зеленых жаб в Южном Туркменистане, Северо-Западном Кыргызстане и Юго-Восточном Казахстане вызвало противоречивую дискуссию (Писанец, 1978; Borkin et al., 2001a; Castellano et al., 1998). Предположили, что они являются гибридами от скрещиваний между диплоидными и тетраплоидными жабами (Писанец, 1978). Однако изучение полиморфизма, полученного в результате RAPD-анализа, у триплоидных особей из Кыргызстана показало их сходство только с найденными рядом тетраплоидами (*B. pewzowi*) и, таким образом, не подтвердило гибридное происхождение местных триплоидов (Delpero et al., 2000). Однако необходимо отметить, что доминантный тип наследования RAPD-маркеров затрудняет использование этого метода при анализе происхождения гибридов. Изучение нами микросателлита *BM224* у триплоидов из Юго-Восточного Казахстана (аллель *b*) также показало их большее сходство с местными тетраплоидами, имевшими аллель *b*, чем с диплоидами (*c*). У триплоидной особи из Южного Туркменистана был отмечен аллель *a*, обычный как для местных диплоидов, так и для тетраплоидов. Поэтому установить происхождение триплоидии у зеленых жаб в этом регионе с помощью данного микросателлита не представляется возможным.

Большую сенсацию вызвала первая находка среди позвоночных полностью триплоидного обоеполого вида зеленых жаб *B. pseudoraddei* из Северного Пакистана (Stöck et al., 1999, 2002). Изучение микросателлита *BM224* у двух особей *B. pseudoraddei* и их лабораторного потомства показало, что все они представлены гомозиготами по аллелю с меньшей молекулярной массой (около 135 п. н.), чем у *B. oblongus* из Ирана (около 145 п. н.). Кроме того, были найдены различия по локусу *Bcal7* между особью *B. pseudoraddei* из Северного Пакистана и особью *B. viridis arabicus* из Сирии (Stöck et al., 2002).

Распространение триплоидного вида *B. pseudoraddei* изучено крайне слабо. Находка триплоидной особи в окр. г. Кабула (Bachmann et al., 1978) позволяет предполагать, что кроме Северного Пакистана этот вид населяет и Афганистан. Кроме того, предполагалось, что особи *B. pseudoraddei* могут быть встречены на Памире в Таджикистане (Stöck et al., 1999). Действительно, необычная экспрессия некоторых аллозимных локусов у памирских жаб могла бы указывать на наличие триплоидных форм в этой популяции (Межжери, Писанец, 1990а). Изучение нами размера генома у жаб из Памира (Лянгар) показало, что количество ядерной ДНК у них близко к триплоидному (табл. 2). Однако согласно нашему анализу микросателлитов *BM224* и *Bcal7*, лянгарские жабы характеризуются другими аллельными вариантами, чем северопакистанские триплоиды. Таким образом, мы не можем подтвердить наличие триплоидного вида *B. pseudoraddei* в Таджикистане. Тем не менее необычный размер генома у этих жаб (табл. 2) ставит вопрос об их таксономическом статусе.

Авторы искренне признательны Т. Алиеву (Баку), Т. Айдынову (Баку), А. Г. Борисовскому (Ижевск), Г. Джукичу (Белград), В. К. Еремченко (Бишкек), М. Л. Калежичу (Белград), С. А. Косушкину (Москва), О. В. Кукушкину (Феодосия), С. Л. Кузьмину (Москва), Г. А. Лада (Тамбов), К. Д. Мильто (Санкт-Петербург), Р. А. Назарову (Москва), М. В. Пестову (Нижний Новго-

род), А. Б. Ручину (Саранск), Д. В. Скоринову (Санкт-Петербург), М. Ф. Тертышникову (Ставрополь), Д. В. Шабанову (Харьков) и А. И. Файзулину (Тольятти) за помощь в проведении полевых исследований и предоставление материалов, а также О. С. Лашиной за помощь в проведении лабораторных работ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48403 и 05-04-48815).

Список литературы

Боркин Л. Я., *Литвинчук С. Н.*, *Розанов Ю. М.*, *Скоринов Д. В. 2004.* О криптических видах (на примере амфибий). Зоол. журн. 83 (8) : 936—960.

Боркин Л. Я., *Розанов Ю. М.*, *Тэрбиш Х.*, *Цауне И. А. 1986а.* Распространение, кариология, таксономическое положение и изменчивость тетраплоидных жаб группы *Bufo viridis* в Монголии. В кн.: Герпетологические исследования в Монгольской Народной Республике. М.: Наука. 120—143.

Боркин Л. Я., *Соколова Т. М.* 1989. Электрофоретическое сравнение диплоидных и тетраплоидных жаб группы *Bufo viridis* (предварительные данные). В кн.: Вопросы герпетологии. Матер. 8-й Всесоюз. герпетологической конф. Киев. 36—38.

Боркин Л. Я., *Тэрбиш Х.*, *Цауне И. А. 1986б.* Тетраплоидные и диплоидные популяции жаб группы *Bufo viridis* из Монголии. ДАН СССР. 287 (3) : 760—764.

Крюков В. И., *Ржепаковский В. Т.*, *Астапов В. П. 1985.* Кариотипическая характеристика жаб семи выборок из Таджикистана. Докл. АН ТаджССР. 28 (10) : 593—595.

Кудрявцев Б. Н., *Ни В. В.*, *Боркин Л. Я.*, *Соловьева Л. В. 1988.* Содержание РНК и белка в клетках диплоидных и тетраплоидных жаб группы *Bufo viridis*. Цитология. 30 (11) : 1324—1331.

Литвинчук С. Н., *Казаков В. И.*, *Анацкий С. Ю. 2002.* Музейные коллекции животных в молекулярно-генетических исследованиях. Успехи соврем. биол. 122 (5) : 444—448.

Литвинчук С. Н., *Розанов Ю. М.*, *Боркин Л. Я.*, *Халтурин М. Д.*, *Тимофеев Б. И.*, *Джукич Г.*, *Калежич М. 2001.* Размер генома и проблемы систематики хвостатых земноводных (на примере Salamandridae и Hynobiidae). В кн.: Вопросы герпетологии. Матер. 1-го съезда герпетологического о-ва им. А. М. Никольского. Пущино; М. 168—170.

Мазик Е. Ю., *Кадырова Б. К.*, *Токтосунов А. Т. 1976.* Особенности кариотипа зеленой жабы (*Bufo viridis*) Киргизии. Зоол. журн. 55 (11) : 1740—1742.

Межжерин С. В., *Писанец Е. М. 1990.* Генетическая структура и происхождение азиатских полиплоидных жаб *Bufo danatensis* Pisanetz, 1978. Доповіді АН УРСР. Серія Б. Геологічні, хімічні та біологічні науки. (Украина) 8 : 68—71.

Межжерин С. В., *Писанец Е. М. 1991.* Генетическая дивергенция представителей комплекса зеленых жаб *Bufo viridis* complex фауны СССР. ДАН СССР. 317 (1) : 222—226.

Межжерин С. В., *Писанец Е. М. 1995а.* Генетическая структура и происхождение тетраплоидной жабы *Bufo danatensis* Pisanetz, 1978 (Amphibia, Bufonidae) Средней Азии. Биохимический полиморфизм и сравнение уровней гетерозиготности диплоидных видов с тетраплоидными. Генетика. 31 (1) : 43—53.

Межжерин С. В., *Писанец Е. М. 1995б.* Генетическая структура и происхождение тетраплоидной жабы *Bufo danatensis* Pisanetz, 1978 (Amphibia, Bufonidae) Средней Азии. Дифференциация географических форм и генетические связи диплоидных видов с тетраплоидным. Генетика. 31 (3) : 342—352.

Орлова В. Ф., *Утешев В. К. 1986.* Тетраплоидная жаба группы *Bufo viridis* из Джунгарского Гоби. В кн.: Герпетологические исследования в Монгольской Народной Республике. М.: Наука. 151—157.

Писанец Е. М. 1978. Про новый полиплоидный вид жаб *Bufo danatensis* Pisanetz., sp. n. из Туркмении. Доповіді АН УРСР. Серія Б. Геологічні, хімічні та біологічні науки. (Украина). 3 : 277—282.

Писанец Е. М. 1991. Новые данные по кариологии *Bufo viridis* complex (Amphibia: Bufonidae) и вопросы происхождения азиатских тетраплоидных жаб. Герпетологические исследования. 1 : 41—50.

Писанец Е. М., *Межжерин С. В. 1996.* Исследования по гибридизации и внешней морфологии азиатских жаб (Amphibia: Bufonidae) и описание нового вида *Bufo shaartusiensis* sp. nov. Доповіді Національної академії наук України. 6 : 147—151.

Писанец Е. М., *Щербак Н. Н. 1979.* Систематика зеленых жаб (Amphibia, Anura) фауны СССР. Вестник зоологии. 4 : 11—16.

Розанов Ю. М., *Виноградов А. Е. 1998.* Прецизионная ДНК-цитометрия: исследование индивидуальной вариабельности размера генома животных. Цитология. 40 (8/9) : 792—799.

Халтурин М. Д., *Литвинчук С. Н.*, *Боркин Л. Я.*, *Розанов Ю. М.*, *Мильто К. Д. 2003.* Генетическая изменчивость у двух форм обыкновенной чесночницы *Pelobates fuscus* (Pelobatidae, Anura, Amphibia), различающихся по размеру генома. Цитология. 45 (3) : 308—323.

Alves J. M., *Coelho M. M.*, *Callares-Pereira M. J. 2001.* Evolution in action through hybridization in an Iberian freshwater fish: a genetic review. Genetica. 111 : 375—385.

Arens P., *Van't Westende W.*, *Bugter R.*, *Smulders M. J. M.*, *Vosman B. 2000.* Microsatellite markers from the European tree frog *Hyla arborea.* Mol. Ecol. 9 : 1944—1946.

Bachmann K., *Konrad A.*, *Oeldorf E.*, *Hemmer H. 1978.* Genome size in the green toads (*Bufo viridis*) group. Experientia. 34 : 331—332.

Balletto E., *Borkin L.*, *Castellano S.*, *Dujsebayeva T.*, *Eremchenko V.*, *Giacoma C.*, *Lattes A.*, *Odierna G. 1999.* Sistematica e filogenesi nel complesso di *Bufo viridis* Laurenti, 1768. Riv. Idrobiologia. 38 : 199—200.

Bennett M. D., *Smith J. B. 1976.* Nuclear DNA amounts in angiosperms. Phil. Trans. Roy. Soc. London. Biol. Sci. 274 : 227—274.

Berlin S., *Merilä J.*, *Ellegren H. 2000.* Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the common frog, *Rana temporaria.* Mol. Ecol. 9 : 1938—1939.

Borkin L. J. 1999. Distribution of amphibians in North Africa, Europe, Western Asia, and the former Soviet Union. In: Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. Baltimore; London: The John Hopkins Univ. Press. 329—420.

Borkin L. J., *Caune I. A.*, *Pisanetz E. M.*, *Rozanovv Y. M. 1986.* Karyotype and genome size in the *Bufo viridis* group. In: Studies in herpetology. 6th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp. Prague. 137—142.

Borkin L. J., *Eremchenko V. K.*, *Helfenberger N.*, *Panfilov A. M.*, *Rosanov J. M. 2001a.* On the distribution of diploid, triploid, and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in south-eastern Kazakhstan. Russ. J. Herpetol. 8 : 45—53.

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 polyploidy green frogs (*Rana esculenta* complex) in eastern Ukraine. Russ. J. Herpetol. 11 : 194—213.

Borkin L. J., *Litvinchuk S. N.*, *Rosanov J. M.*, *Džukić G.*, *Kalezić M. L. 2005.* Genome size variation in the Balkan anurans. In: Herpetologia Petropolitana. Proc. of the 12th Ordinary General meeting of the Societas Europaea Herpetologica. St. Petersburg. 16—19.

Borkin L. J., *Litvinchuk S. N.*, *Rosanov J. M.*, *Khalturin M. D.*, *Lada G. A.*, *Borissovsky A. G.*, *Faizulin A. I.*, *Kotserzhinskaya I. M.*, *Novitsky R. V.*, *Ruchin A. B. 2003.* New data on the distribution of two cryptic forms of the common spadefoot toad (*Pelobates fuscus*) in Eastern Europe. Russ. J. Herpetol. 10 : 115—122.

Borkin L. J., *Litvinchuk S. N.*, *Rosanov J. M.*, *Milto K. D. 2001b.* Cryptic speciation in *Pelobates fuscus* (Anura, Pelobatidae): evidence from DNA flow cytometry. Amphibia—Reptilia. 22 : 387—396.

Borkin L. J., *Rosanov J. M.*, *Litvinchuk S. N. 2000.* Nuclear DNA content in some green toads (*Bufo viridis* complex) of Turkey and Iran. Russ. J. Herpetol. 7 : 171—180.

Borkin L. J., Vinogradov A. E., Brushko Z. K., Kuzmin S. L. 1995. New records of tetraploid toads (*Bufo viridis* group) from Alma-Ata and Taldy-Kurgan region, Kazakhstan. Russ. J. Herpetol. 2 : 174—175.

Burton D. W., Bicham J. W., Genoways H. H. 1989. Flow-cytometric analyses of nuclear DNA content in four families of neotropical bats. Evolution. 43 : 756—765.

Castellano S., Giacoma C., Dujsebayeva T., Odierna G., Balletto E. 200. Diploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex): analysis of morphometrical differences among females. In: Atti del I Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali. 385—390.

Castellano S., Giacoma C., Ryan M. J. 2003. Call degradation in diploid and tetraploid green toads. Biol. J. Linn. Soc. 78 : 11—26.

Castellano S., Tontini L., Giacoma C., Lattes A., Balletto E. 1998. The evolution of release and advertisement calls in green toads (*Bufo viridis* complex). Biol. J. Linn. Soc. 77 : 379—391.

Delpero M., Cervella P., Borkin L. J., Dujsebayeva T., Eremchenko V. K., Balletto E. 2000. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis of Asiatic population of the *Bufo viridis* complex. In: Atti del I Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica. Torino: Museo Regionale di Scienze Naturali. 299—304.

Dujsebayeva T., Castellano S., Giacoma C., Balletto E., Odierna G. 1997. On the distribution of diploid and tetraploid green toads of the *Bufo viridis* complex (Anura, Bufonidae) in southern Kazakhstan. Asiatic Herpetol. Res. 7 : 27—31.

Dujsebayeva T., Castellano S., Magni P., Odierna G. 2004. New data on distribution of Amphibians and reptilies in the Aral Sea Basin and surrounding areas of Kazakhstan. Part I. The green toads of *Bufo viridis* complex (Amphibia: Anura). Selevinia. 2003: 60—65.

Evans B. J., Kelley D. B., Tinsley R. C., Melnick D. J., Cannatella D. C. 2004. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploidy evolution. Mol. Phylog. Evol. 33 : 197—213.

Garner T. W. J., Gautschi B., Rothlisberger S., Reyer H.-U. 2000. A set of CA repeat microsatellite markers derived from the pool frog, *Rana lessonae.* Mol. Ecol. 9 : 2173—2175.

Jehle R., Arntzen J. W. 2002. Review: microsatellite markers in amphibian conservation genetics. Herpetol. J. 12 : 1—9.

Johnson O. W., Utter P. M., Rabinovitch P. S. 1987. Interspecific differences in salmonid cellular DNA identified by flow cytometry. Copeia. 1987 : 1001—1009.

Krupa A. P., Jehle R., Dawson D. A., Gentle L. K., Gibbs M., Arntzen J. W., Burke T. 2002. Microsatellite loci in the crested newt (*Triturus cristatus*) and their utility in other newt taxa. Conservation Genetics. 3 : 87—89.

Licht L. E., Lowcock L. A. 1991. Genome size and metabolic rate in salamanders. Comp. Biochem. Physiol. 100B : 83—92.

Litvinchuk S. N., Borkin L. J., Džukić G., Kalezić M. L., Khalturin M. D., Rosanov Y. M. 1999. Taxonomic status of *Triturus karelinii* on the Balkans, with some comments about other crested newt taxa. Russ. J. Herpetol. 6 : 153—163.

Litvinchuk S. N., Borkin L. J., Rosanov J. M. 2004. Inta- and interspecific genome size variation in hynobiid salamanders of Russia and Kazakhstan: determintaion by flow cytometry. Asiatic Herpetol. Res. 10 : 282—294.

Litvinchuk S. N., Borkin L. J., Rosanov J. M., Skorinov D. V., Khalturin M. D., Džukić G., Kalezić M. L., Mazanaeva L. F. 2005a. Geographic differentiation in newts (*Triturus*) of eastern Europe: genome size, allozymes, and morphology. In: Herpetologia Petropolitana. Proc. of the 12th Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica. St. Petersburg. 51—54.

Litvinchuk S. N., Rosanov J. M., Borkin L. J. 2001. Natural autotriploidy in the Danube newt, *Triturus dobrogicus* (Salamandridae). Russ. J. Herpetol. 8 : 74—76.

Litvinchuk S. N., Zuiderwijk A., Borkin L. J., Rosanov J. M. 2005b. Taxonomic status of *Triturus vittatus* (Amphibia: Salamandridae) in western Turkey: trunk vetebrate count, genome size and allozyme data. Amphibia—Reptilia. 26 : 305—323.

Lizana M., Marquez R., Martin-Sanchez R., Ciudad J., Lopez A., Orfao A. 2000. Determination of cellular DNA content of Iberian salamanders by flow cytometry. Amphibia—Reptilia. 21 : 411—418.

Lockwood S. F., Derr J. N. 1992. Intra- and interspecific genome size variation in the salmonidae. Cytogenet. Cell Genet. 59 : 303—306.

Lockwood S. F., Holland B. S., Bickham J. W., Hanks B. G., Bull G. G. 1991a. Intraspecific genome size variation in a turtle (*Trachemys scripta*) exhibiting temperature-dependent sex determination. Can. J. Zool. 69 : 2306—2310.

Lockwood S. F., Seavey B. T., Dillinger R. E., jr., Bickham J. W. 1991b. Variation in DNA content among age classes of broad whitefish (*Coregonus nasus*) from the Sagavanirktok River Delta. Can. J. Zool. 69 : 1335—1338.

Mac Culloch R. D., Upton D. E., Murphy R. W. 1996. Trends in nuclear DNA content among amphibians and reptiles. Comp. Biochem. Physiol. 113B : 601—605.

Mazin A. L., Borkin L. J. 1979. Nuclear DNA content in green frogs of the genus *Rana.* Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin. 55 : 217—224.

Murphy R. W., Lowcock L. A., Smith C., Darevsky I. S., Orlov N., Mac Culloch R. D., Upton D. E. 1997. Flow cytometry in biodiversity surveys: methods, utility, and constraints. Amphibia—Reptilia. 18 : 1—13.

Neff B. D., Gross M. R. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. Evolution. 55 : 1717—1733.

Newman R. A., Squire T. 2001. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). Mol. Ecol. 10 : 1987—1100.

Roth P. 1986. An overview of the systematics of the *Bufo viridis* group in Middle and Central Asia. In: Studies in herpetology. 6th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp. Prague. 127—130.

Roth P., Ráb P. 1986. Karyotype analysis of the *Bufo viridis* species group: systematic implications. In: Studies in herpetology. 6th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp. Prague. 131—136.

Rowe G., Beebee T. J. C., Burke T. 1997. A further four polymorphic microsatellite loci in the natterjack toad *Bufo calamita*. Conservation Genetics. 1 : 371—372.

Rowe G., Beebee T. J. C., Burke T. 2000. A microsatellite analysis of natterjack toad, *Bufo calamita*, metapopulations. OIKOS, Copenhagen. 88 : 641—651.

Scribner K. T., Arntzen J. W., Burke T. 1994. Comparative analysis of intra- and inter-population genetic diversity in *Bufo bufo* using allozyme, single locus microsatellite and minisatellite, and multilocus minisatellite data. Mol. Biol. Evol. 11 : 737—748.

Scribner K. T., Arntzen J. W., Burke T. 1997. Effective number of breeding adults in *Bufo bufo* estimated from age-specific variation at minisatellite loci. Mol. Ecol. 6 : 701—712.

Scribner K. T., Arntzen J. W., Cruddace N., Oldham R. S., Burke T. 2001. Environmental correlates of toad abundance and population genetic diversity. Biol. Conservation. 98 : 201—210.

Scribner K. T., Pearce J. M. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. In: molecular methods in ecology. London: Blackwell scientific. 235—273.

Sherwood S. W., Patton J. L. 1982. Genome evolution in pocket gophers (genus *Thomomys*). II. Variation in celular DNA content. Chromosoma. 85 : 163—179.

Stöck M. 1997. Untersuchungen zur Morphologie und Morphometrie di- und tetraploider Grünkröten (*Bufo viridis*-Komplex) in Mittelasien (Amphibia: Anura: Bufonidae). Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden. 49 : 193—222.

Stöck M. 1998a. Mating call differences between diploid and tetraploid toads (*Bufo viridis* complex) in Middle Asia. Amphibia—Reptilia. 19 : 29—42.

Stöck M. 1998b. Tetraploid toads (*Bufo viridis* complex) from north-western China and preliminary taxonomic conclusions for *Bufo nouettei* Mosquard, 1910. Zeitschift für Feldherpetology. 5 : 139—166.

Stöck M., *Frynta D.*, *Grosse W.-R.*, *Steinlein C.*, *Schmid M. 2001a.* A review of the distribution of diploid, triploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in Asia including new data from data from Iran and Pakistan. Asiatic Herpetol. Res. 9 : 77—100.

Stöck M., *Grosse W.-R. 1997.* Erythrocyte size and ploidy determination in green toads (*Bufo viridis* complex) from Middle Asia. Alytes. 15 : 72—90.

Stöck M., *Günther R.*, *Böhme W. 2001b.* Progress towards a taxonomic revision of the Asian *Bufo viridis* group: current status of nominal taxa and unsolved problems (Amphibia: Anura: Bufonidae). Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden. 51 : 253—319.

Stöck M., *Lamatsch D. K.*, *Steinlein C.*, *Epplen J. T.*, *Grosse W.-R.*, *Hock R.*, *Klapperstück T.*, *Lampert K. P.*, *Scheer U.*, *Schmid M.*, *Schartl M. 2002.* A bisexually reproducing all-triploid vertebrate. Nature Genet. 30 : 325—328.

Stöck M., *Schmid M.*, *Steinlein C.*, *Grosse W.-R. 1999.* Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions. Ital. J. Zool. 66 : 215—232.

Stöck M., *Steinlein C.*, *Lamatsch D. K.*, *Schartl M.*, *Schmid M. 2005.* Multiple origin of tetraploid taxain the Eurasian *Bufo viridis* subgroup. Genetica. 124 : 255—272.

Tikel D., *Paetkau D.*, *Cortinas M. N.*, *Leblois R.*, *Moritz C.*, *Estoup A. 2000.* Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the invasive toad species *Bufo marinus.* Mol. Ecol. 9 : 1927—1929.

Vinogradov A. E., *Borkin L. J.*, *Günther R.*, *Rosanov J. M. 1990.* Genome elimination in diploid and triploid *Rana esculenta* males: cytological evidence from DNA flow cytometry. Genome. 33 : 619—627.

Поступила 20 X 2005

VARIATION OF MICROSATELLITES *BM224* AND *BCAL7* IN POPULATIONS OF GREEN TOADS (*BUFO VIRIDIS* COMPLEX) WITH VARIOUS NUCLEAR DNA CONTENT AND PLOIDY

S. N. Litvinchuk,[1] *Ju. M. Rosanov,*[1] *N. M. Usmanova,*[1] *L. Ja. Borkin*,[2] *L. F. Mazanaeva,*[3] *V. I. Kazakov*[1]

[1] Institute of Cytology RAS, [2] Zoological Institute RAS, St. Petersburg, and [3]Dagestan State University, Makhachkala; e-mail: slitvinchuk@yahoo.com

We studied variation of microsatellites *BM224* and *Bcal7* in three species of the *Bufo viridis* diploid-polyploid complex. We found that locus *Bcal7* in all examined samples was monomorphic. Three alleles of microsatellite *BM224* were found. Among tetraploid toads, the western species *B. oblongus* had only one allele variant, whereas the eastern species *B. pewzowi* had two other alleles. Similar distribution of alleles was observed in triploid specimens, collected in the area borders of tetraploid and diploid species. Among samples of diploid toad *B. viridis*, we found all three allele variants of microsatellite *BM224*. Their distribution was geographically determined. A comparison of allele distribution with genome size variation in diploid toads showed very similar patterns.