

ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТА BM224 У ЗЕЛЕНЫХ ЛЯГУШЕК РОДА *RANA*

© Н. М. Усманова,¹ С. Н. Литвинчук,¹ Е. А. Казакова,² В. И. Казаков¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург;
¹ электронный адрес: ntusmanova@gmail.com

В геномах восьми видов зеленых лягушек рода *Rana* (*R. ridibunda*, *R. cf. bedriagae*, *R. cretensis*, *R. esculenta*, *R. lessonae*, *R. shquiperica*, *R. saharica* и *R. nigromaculata*) обнаружен вариабельный по длине микросателлитный повтор BM224, ранее отмечавшийся только у представителей рода *Bufo*. Обсуждается возможность использования этого генетического маркера для идентификации видов зеленых лягушек.

Ключевые слова: микросателлиты, зеленые лягушки, *Rana*, идентификация видов.

Морфологические критерии не всегда дают возможность точно отнести данную конкретную особь к тому или иному таксону. Современные методы молекулярной биологии предоставляют исследователям дополнительные возможности для идентификации видов. В последнее время широкое распространение получили молекулярные методы анализа микросателлитных повторов, обнаруженных в геномах многих видов амфибий (Scribner et al., 1994, 1997; Arens et al., 2000; Newman, Squire, 2001; Krupa et al., 2002; Berlin et al., 2004), в том числе и у зеленых лягушек (Garner et al., 2000; Zeisset et al., 2000; Primer, Merialä, 2002; Christiansen, 2005). При анализе любых повторяющихся элементов генома можно работать с фиксированным в спирте и высушенным биологическим материалом, используя даже субфоссильные и музейные образцы (Литвинчук и др., 2002). Микросателлитные локусы, как правило, характеризуются высокой вариабельностью, в связи с чем их часто используют для анализа внутрипопуляционной изменчивости и межпопуляционных взаимоотношений (Scribner, Pearce, 2000; Neff, Gross, 2001; Scribner et al., 2001; Jehle, Arntzen, 2002). В то же время использование микросателлитов для идентификации видовой принадлежности морфологически сходных животных затруднено несколькими обстоятельствами. Во-первых, в настоящее время микросателлитные повторы обнаружены в геномах далеко не всех видов бесхвостых амфибий. Во-вторых, некоторые микросателлиты, например *Bcal7* у зеленых жаб рода *Bufo* (Литвинчук и др., 2006), могут быть мономорфными и непригодными для такого рода анализа. В-третьих, микросателлиты зачастую видоспецифичны и амплифицируются только у особей одного вида. Решить все эти проблемы можно с помощью универсального полиморфного микросателлита, имеющегося в геномах большого числа видов. Одним из таких универсальных микросателлитов является BM224, впервые обнаруженный в геноме американской жабы-аги *Bufo marinus* (Scribner et al., 1994; номер в базе данных GenBank AF273095), а затем в геномах зеленых жаб *Bufo viridis* complex (Stöck et al., 2002; Литвинчук и др., 2006).

В настоящей работе авторы показали возможность идентификации некоторых видов зеленых лягушек методом анализа изменчивости длины микросателлитной последовательности BM224.

Материал и методика

Выделение ДНК. В работе использовали препараты ДНК, выделенные из крови или мышц 53 животных, относящихся к восьми видам зеленых лягушек (табл. 1, 2).

Кусочки мышц (0.1—5.0 г) помещали в фарфоровую ступку, заливали жидким азотом и истирали до порошкообразного состояния, после чего переносили в микропробирку. К пробе добавляли 1 мл лизирующего буферного раствора, содержащего 0.15 мг/мл протеиназы K, 0.1 М NaCl, 20 мМ ЭДТА, 1 % додецилсульфата натрия и 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0. В случае выделения ДНК из крови к 100 мкл цельной крови добавляли 1 мл лизирующего буферного раствора. Пробы инкубировали 12 ч при 37 °C. После инкубации ДНК из лизата выделяли стандартным фенольно-хлороформным методом с последующим осаждением этиловым спиртом. Осадок ДНК промывали 70%-ным этанолом, высушивали и растворяли в буферном растворе TE (10 мМ Трис-HCl, pH 7.4 и 1 мМ ЭДТА, pH 8.0).

Микросателлитный локус BM224 был амплифицирован методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве праймеров использовали следующие олигонуклеотидные последовательности: прямой праймер 5'-GGGAT-CTGTGCAGATGGG-3' и обратный праймер 5'-GCTGAT-CTTGCACAACTTTG-3' (Tikel et al., 2000). Реакционная смесь содержала 0.2 мМ каждого dNTP, 67 мМ Tris-HCl, pH 8.3, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Tween 20, 0.12 мг/мл БСА, 8%-ный глицерол, по 0.25 мМ прямого и обратного праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы (Fermentas, Литва) и 1.5 мкг ДНК. Температурный режим ПЦР: (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 —

Таблица 1 (продолжение)

Номер	Место сбора	Широта	Долгота	<i>n</i> ^a	Наличие фрагмента ^b						
<i>Rana lessonae</i>											
40	Стрельна (Калининградская обл., Россия)	54°26'N	20°38'E	1	150	165	170	180	185	200	—
41	Гора Стрельная (Самарская обл., Россия)	53°26'N	49°48'E	2	+	+	+	+	+	+	—
<i>Rana shquiperica</i>											
42	Вирпазар (Черногория)	42°15'N	19°05'E	2	150	165	180	195	200	—	—
<i>Rana saharica</i>											
43	Табарка (Тунис)	36°55'N	08°45'E	1	150	165	180	195	200	210	—
44	Тунис (Тунис)	36°51'N	10°18'E	1	+	+	+	—	+	—	—
45	Фернана (Тунис)	36°40'N	08°42'E	1	150	165	180	195	200	210	—
<i>Rana nigromaculata</i>											
46	Уссурийск (Приморский край, Россия)	43°48'N	131°58'E	1	150	165	180	445	465	—	—
47	Озеро Хасан (Приморский край, Россия)	42°27'N	130°38'E	2	150	165	180	445	465	—	—

^a — количество особей, собранных в данной географической точке. ^b Знаком «+» обозначено наличие фрагмента данной длины, знаком «—» — его отсутствие. ^c Геномный состав гибридной *Rana esculenta* определялся с помощью проточной ДНК-цитометрии; RL — диплоид, геном которого состоит из одного хромосомного набора *R. ridibunda* и одного набора *R. lessonae*; RRL — триплоид с двумя наборами *R. ridibunda* и одним *R. lessonae*; RLL — триплоид с двумя наборами *R. lessonae* и одним *R. ridibunda*.

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).

Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле. По окончании электрофореза фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом излучении трансиллюминатора после окраски геля бромистым этидием. В качестве маркеров молекулярной массы ДНК использовали ДНК фага λ , расщепленную рестриктазой *PstI*, и различные аллели микросателлита *BM224* с известной длиной, ранее обнаруженные нами в геномах зеленых жаб (*Bufo viridis* complex; см.: Литвинчук и др., 2006).

Результаты и обсуждение

Микросателлит *BM224* обнаружен в геноме всех восьми исследованных видов зеленых лягушек. После проведения электрофоретического разделения продуктов ПЦР всегда наблюдался целый спектр полос (от трех до шести), который стабильно воспроизводился в повторных экспериментах. Количество амплифицированных фрагментов, их длина и встречааемость в геномах исследованных видов зеленых лягушек рода *Rana* указаны в табл. 1 и 2.

Ранее микросателлит *BM224* отмечался только у нескольких видов рода *Bufo* (*B. marinus*, *B. variabilis*, *B. pseudeudoraddei*, *B. viridis*, *B. turanensis*, *B. oblongus* и *B. pewzowi*). При использовании в ПЦР одних и тех же олигонуклеотидных праймеров и аналогичной термосхемы реакции нам удалось обнаружить дискретные фрагменты ДНК у представителей другого семейства (Ranidae). Интересно,

что наши попытки выявить аналогичные структуры у представителей хвостатых амфибий сем. Salamandridae (роды *Triturus*, *Cynops*, *Neurergus*, *Notophthalmus*, *Pachytriton* и *Pleurodeles*) не увенчались успехом. Не исключено, что наличие или отсутствие в геноме подобных структур отражает филогенетические связи на уровне отрядов, а этот микросателлит характерен для геномов всех бесхвостых амфибий.

Микросателлит *BM224* может быть использован как универсальный полиморфный маркер для идентификации зеленых лягушек, так как у некоторых видов нами были отмечены специфичные ПЦР-фрагменты (табл. 1, 2). Для большинства исследованных зеленых лягушек (56 %) характерно наличие тетрады фрагментов длиной 150, 165, 185 и 200 н. п. (рис. 1). Эта тетрада выявлена у подавляющего большинства изученных особей *R. ridibunda* и *R. lessonae*. Фрагмент длиной 150 н. п. встречается в геноме всех без исключения зеленых лягушек. Фрагмент длиной 165 н. п. отмечен в 91 % случаев (исключение: три особи *R. ridibunda* и по одной особи *R. cretensis* и *R. shquiperica*). В геномах 70 % изученных особей имелся фрагмент длиной 185 н. п. Он не был отмечен только у *R. cretensis*, *R. shquiperica* и *R. saharica*, представленных маленькими выборками. Фрагмент длиной 200 н. п. в геномах зеленых лягушек встречается с вероятностью 79 %. Он не отмечен только у *R. nigromaculata*. У всех остальных изученных видов он встречается с вероятностью от 20 (*R. cf. bedriagae*) до 100 (*R. lessonae*, *R. shquiperica* и *R. saharica*) %. Наличие аллеля длиной 150 н. п. вместе с более длинными фрагментами из тетрады позволяет отличать зеленых лягушек от всех ранее изученных видов жаб, которые, как правило, характеризуются более короткими мажорными

Таблица 2

Длина и встречааемость ПЦР-фрагментов у восьми видов зеленых лягушек

Длина ПЦР-фраг- ментов, н. п.	Встречаемость ПЦР-фрагментов, %							
	Rr, ^a n ^b = 29	Rb, n = 5	Rc, n = 1	Re, n = 7	Rl, n = 3	Rq, n = 2	Rs, n = 3	Rn, n = 3
465	—	—	—	100.0	—	—	—	100.0
445	—	—	—	100.0	—	—	—	100.0
220	—	—	100	—	—	—	—	—
210	—	—	—	—	—	—	33.3	—
200^b	89.7	20.0	100	42.9	100.0	100	66.7	—
195	—	—	—	—	—	100	100.0	—
185	89.7	80.0	—	42.9	100.0	—	—	33.3
180	41.4	—	100	—	33.3	100	66.7	—
170	17.2	—	100	—	33.3	—	—	—
165	89.7	100.0	—	100.0	100.0	50	100.0	100.0
150	100.0	100.0	100	100.0	100.0	100	100.0	100.0
135	3.4	100.0	—	—	—	—	—	—

^a Буквенные индексы обозначают: Rr — *Rana ridibunda*, Rb — *R. cf. bedriagae*, Rc — *R. cretensis*, Re — *R. esculenta*, Rl — *R. lessonae*, Rq — *R. shquiperica*, Rs — *R. saharica*, Rn — *R. nigromaculata*. ^b — объем выборки. ^b Полужирным шрифтом выделены фрагменты, характерные для тетрады.

полосами длиной 135—155 н. п. (Tikel et al., 2000; Stöck et al., 2002; Литвинчук и др., 2006).

Предложенный микросателлитный анализ применим и для идентификации морфологически сходных *R. ridibunda* и *R. cf. bedriagae*, которые, за редким исключением, хорошо дифференцируются по наличию или отсутствию фрагмента длиной 135 н. п. (табл. 1, 2; рис. 2). Этот фрагмент был отмечен только в геноме *R. cf. bedriagae* (Юго-Восточная Турция) и у одной особи *R. ridibunda* из Западной Турции. Кроме того, первый вид характеризуется отсутствием у большинства изученных особей (80 %) фрагмента длиной 200 н. п., который встречается у большинства особей *R. ridibunda* (90 %).

Гибридогенный вид *R. esculenta* хорошо отличается от всех остальных западно-палеарктических видов зеленых лягушек по наличию двух ПЦР-фрагментов длиной

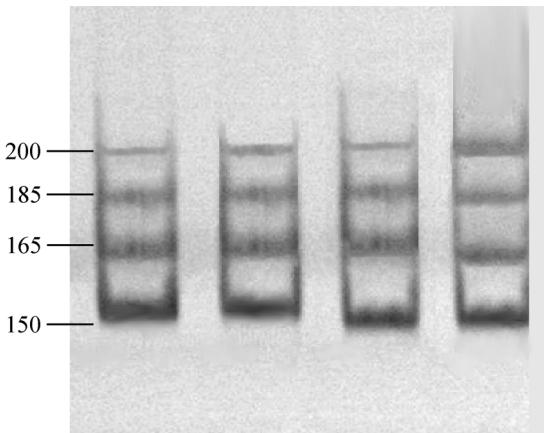


Рис. 1. Тетрада ПЦР-фрагментов длиной 150, 165, 185 и 200 н. п. у четырех особей *Rana ridibunda*, 12%-ный полиакриламидный гель (негатив изображения).

Цифры слева — размер фрагментов, н. п.

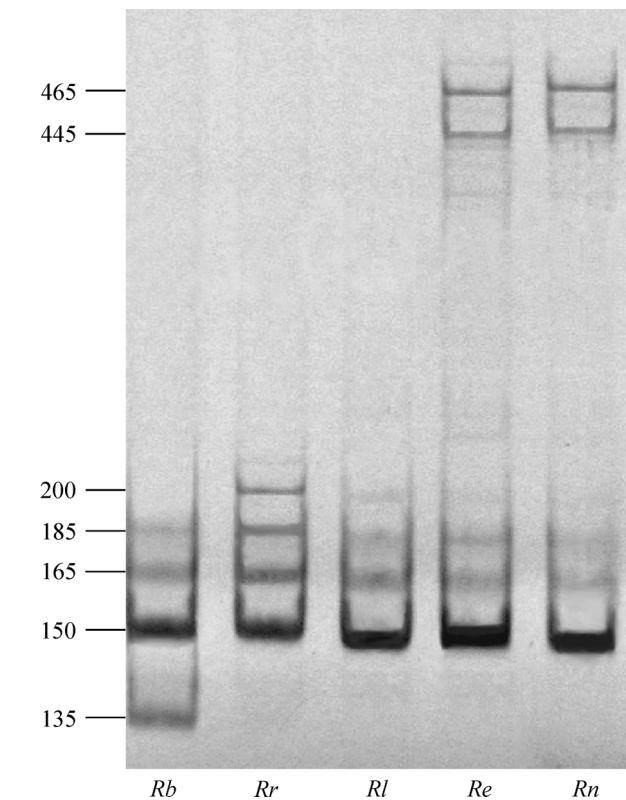


Рис. 2. Взаимное расположение амплифицированных фрагментов микросателлита BM224 в геномах некоторых видов зеленых лягушек, 12%-ный полиакриламидный гель (негатив изображения).

Цифры слева — размер фрагментов, н. п. Rb — *R. cf. bedriagae*, Rr — *R. ridibunda*, Rl — *R. lessonae*, Re — *R. esculenta*, Rn — *R. nigromaculata*.

445 и 465 н. п. (рис. 2). Эти фрагменты отмечены в геноме и диплоидных, и триплоидных особей *R. esculenta*, тогда как в геномах родительских видов (*R. ridibunda* и *R. lessonae*) они не обнаружены. Удивительно, но этими же фрагментами характеризовалась и дальневосточная *R. nigromaculata*.

Авторы искренне признательны Ю. М. Розанову (Санкт-Петербург) за определение геномного состава у *R. esculenta* и всем нашим многочисленным коллегам за помощь в проведении полевых исследований и предоставление материалов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01184 и 09-04-90475) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- 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., Усманова Н. М., Боркин Л. Я., Мазанаева Л. Ф., Казаков В. И. 2006. Изменчивость микросателлитов BM224 и Bcal7 в популяциях зеленых жаб (*Bufo viridis* complex), различающихся по размеру генома и пloidности. Цитология. 48 (4): 332—345.
- 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.
- Berlin S., Merila J., Ellegren J. H. 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the common frog, *Rana temporaria*. Mol. Ecol. 9: 1938—1939.
- Christiansen D. G. 2005. A microsatellite-based method for genotyping diploid and triploid water frogs of the *Rana esculenta* hybrid complex. Mol. Ecol. Notes. 5: 190—193.
- 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. Herpet. J. 12: 1—9.
- 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. Conserv. Genet. 3: 87—89.
- 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: 1087—1100.
- Primmer C. R., Merilä J. 2002. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. Conserv. Genet. 3: 445—449.
- 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. Conserv. 98: 201—210.
- Scribner K. T., Pearce J. M. 2000. Molecular methods in ecology. London: Blackwell Scientific. 352 p.
- Stock M., Lamatsch D. K., Steinlein C., Epplen J. T., Grossse W.-R., Hock R., Klapperstück T., Lampert K. P., Scheer U., Schmid M., Schartl M. 2002. A bisexual reproducing all-triploid vertebrate. Nat. Genet. 30: 325—328.
- Tikell 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.
- Zeisset I., Rowe G., Beebe T. J. C. 2000. Polymerase chain reaction primers for microsatellite loci in the north European water frogs *Rana ridibunda* and *R. lessonae*. Mol. Ecol. 9: 1171—1193.

Поступила 15 III 2010

VARIATION OF BM224 MICROSATELLITE IN GREEN FROGS OF THE GENUS *RANA*

N. M. Usmanova,¹ S. N. Litvinchuk,¹ E. A. Kazakova,² V. I. Kazakov¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² Military-Medical Academy, St. Petersburg;
¹ e-mail: nmusmanova@gmail.com

The variable microsatellite repeat BM224 has been discovered in the genomes of eight species of green frogs (*Rana ridibunda*, *R. cf. bedriagae*, *R. cretensis*, *R. esculenta*, *R. lessonae*, *R. shquiperica*, *R. saharica*, *R. nigromaculata*). Earlier, this repeat had been observed in members of the genus *Bufo*. In this paper, a possibility of usage of this genetic marker for species identification is discussed.

Key words: microsatellites, green frogs, *Rana*, species identification.