

УДК 576.316.2

КАРИОТИП ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*© 2025 г. А. О. Травина^{1, *}, Г. Н. Почукалина¹, О. И. Подгорная¹, В. Н. Стефанова¹¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

* E-mail: alotra1@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.12.2024

После доработки 22.01.2025

Принята к публикации 23.01.2025

Работа посвящена цитогенетическому исследованию одного из модельных видов амфибий — травяной лягушки *Rana temporaria*. Цель работы — создание стандартного кариотипа *R. temporaria*, выявление хромосомных маркеров и уточнение структуры генома. Мы проанализировали структуру кариотипа, распределение гетерохроматина и специфическую локализацию некоторых повторяющихся последовательностей на хромосомах, используя различные методы окрашивания, включая рутинное окрашивание красителем Гимза, выявление С-дисков, окрашивание флуоресцентными красителями DAPI, CMA3 и SYBR Green и флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с использованием зондов к 5S рДНК и тандемному повтору S1A. Кариотип состоит из 26 хромосом (NF = 52): 5 пар крупных и 8 пар мелких хромосом. С-окрашивание выявило гетерохроматиновые блоки в центромерных районах большинства хромосом, а на некоторых хромосомах были обнаружены дополнительные интерстициальные С-блоки. Окрашивание как DAPI, так и CMA3 показало в целом равномерную флуоресценцию на всех хромосомах, за исключением единственного DAPI-негативного участка, соответствующего ЯОР. Окрашивание SYBR Green показало интенсивную флуоресценцию в центромерных районах некоторых хромосом. Методом FISH с зондом к 5S рДНК мы подтвердили расположение этого гена на коротком плече 7-й пары хромосом. Картирование методом FISH тандемного повтора S1A показало расположение сигналов на обоих плечах хромосомы 1, на коротких плечах хромосом 2–5 и на длинных плечах хромосом — 7 и 9. Обсуждаются трудности в выявлении G- и Q-дисков на хромосомах амфибий. Полученные данные сравниваются с результатами предыдущих исследований. Впервые использованное нами для описания кариотипа окрашивание SYBR Green может стать полезным методом для анализа хромосом амфибий в связи с трудностями выявления дисков с помощью традиционных методов.

Ключевые слова: хромосомы, амфибии, гетерохроматин, С-бэндинг, DAPI, CMA3, SYBR Green, ядрышковый организатор, 5S рДНК, тандемный повтор S1A

Принятые сокращения: рДНК — рибосомальная ДНК; ТП — тандемный повтор; ЯОР — ядрышкообразующий район, ядрышковый организатор; CMA3 — хромомицин А3; DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол; FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*.

DOI: 10.31857/S0041377125010057, **EDN:** DEQITM

Амфибии — многочисленный класс наземных позвоночных животных с большой вариабельностью размеров генома [размеры геномов варьируют, по крайней мере, в 100 раз (Gregory, 2025)]. Цитогенетика амфибий имеет большое значение для анализа таксономических отношений и систематики тысяч видов этих животных по всему миру. Амфибии имеют богатую историю в области изучения ядерных структур, которая началась еще до того, как была установлена наследственная роль хромосом. Пионерские цитологические исследования клеток амфибий, проведенные в XIX веке Флеммингом (Flemming, 1882), Шульце (Schultze, 1887) и Рюккертом (Rückert, 1892), заложили основу для понимания важности хромосомных ис-

следований и стали основополагающими в области цитологии, гистологии, эмбриологии. Со времени первых работ интерес к цитогенетике амфибий не ослабевал; в последующие полвека была проведена работа по описанию числа хромосом и их морфологии с помощью рутинных методов окрашивания (Stohler, 1928; Iriki, 1930; Minouchi, Iriki, 1931; Prokofieva, 1935). В этих исследованиях препараты хромосом были получены методом давления без гипотонической обработки (которая еще не была открыта), поэтому изучение морфологии хромосом и даже определение их числа в кариотипе были затруднены.

Современная цитогенетика предоставила большой объем информации о морфологии и структур-

но-функциональной организации хромосом, гетероморфизме половых хромосом и о варьировании числа хромосом в кариотипах разных амфибий. Однако данные полногеномного секвенирования амфибий долгое время были ограничены. В 2010 году был секвенирован геном западной когтистой лягушки (*Xenopus tropicalis*), который стал первой сборкой генома для класса Amphibia (Hellsten et al., 2010). Хотя секвенированные относительно компактные геномы двух видов *Xenopus* [геном *X. laevis* (Session et al., 2016)), а также *Nanorana parkeri* (Sun et al., 2015)] были доступны в течение десятилетия, данные полногеномного секвенирования других видов стали появляться только в последнее время. Это объясняется большим размером геномов многих видов амфибий и высоким содержанием повторяющихся последовательностей (Kwon, 2017; Sun et al., 2020).

Геномы эукариот значительно различаются по размерам и структуре, но одним из их общих и характерных свойств является многообразие и обилие повторяющихся последовательностей. Выделяют два типа повторяющихся последовательностей — тандемные повторы (ТП), которые также называют сателлитной ДНК, и диспергированные повторы (см. обзор Biscotti et al., 2015). В ранних исследованиях предполагали, что повторяющиеся последовательности играют значительную роль в различиях размеров геномов амфибий (Baldari, Amaldi, 1977; Bozzoni, Beccari, 1978; Birstein, 1984). Исследование повторяющихся последовательностей играет важную роль в исследовании кариотипов и может дать ценную информацию о структуре генома, эволюции и биоразнообразии. Несмотря на это, данные о повторяющихся последовательностях амфибий достаточно скудны и в основном ограничиваются десятком последовательностей, описанных еще в догеномную эпоху. Например, для палеарктических бурых лягушек рода *Rana* описан единственный родоспецифичный ТП (S1) (Cardone et al., 1997). Семейство S1 включает повтор S1A, встречающийся у всех европейских видов бурых лягушек, и повтор S1B, обнаруженный у большинства, но не у всех видов (Cardone et al., 1997; Picariello et al., 2002; Feliciello et al., 2005). Исследование молекулярной организации и цитогенетическое картирование повторяющихся последовательностей ДНК могут дать полезные характеристики для сравнительной геномики и имеют решающее значение для понимания эволюции геномов.

На долю отряда бесхвостых земноводных Anura приходится более 80 % сохранившихся видов амфибий (Frost, 2024). Семейство Ranidae (настоящие лягушки), является одним из наиболее изученных семейств отряда Anura, наряду с Pipidae и Bufonidae, и включает несколько родов и 455 видов (Frost, 2024). Кариотипический анализ амфибий, принадлежащих к семейству Ranidae, проводили преимущественно среди видов рода *Rana* (Guillemin, 1967; Kuramoto, 1972; Schmid, 1980; Spasić-Bošković et al., 1997). К настоящему времени опубликовано 12 (по состоянию на январь 2025 г.) геномов Ranidae, включая геном травяной лягушки *R. temporaria* (Streicher et al., 2021), которая обитает в Европе. *R. temporaria* — популярный объект биологических исследований в области физиологии (Karanova, 2021), биологии развития (Gruzova, Parfenov, 1977; Ilicheva et al., 2019; Bogolyubov et al., 2023), экологии (Ruthsatz et al., 2022) и эволюции половых хромосом (Rodrigues et al., 2013, 2015). Для решения дальнейших задач, а именно изучения распределения повторяющихся последовательностей в геноме, возникла необходимость исследования кариотипа с помощью набора современных цитогенетических методов.

Хотя данных, касающихся кариотипа *R. temporaria*, опубликовано достаточно много, все они довольно старые. Диплоидное число хромосом было впервые установлено Вичи (Witschi, 1922). Кариотип данного вида исследовали также для популяций из Швеции (Wickbom, 1945), Франции (Guillemin, 1967; Nishioka et al., 1987), Германии (Ullerich, 1967; Morescalchi, 1967), России (Московская и Мурманская области (Бирштейн, 1981)), Балканского полуострова (Spasić-Bošković et al., 1997), Украины (Песков и др., 2004; Манило, 2005), Белоруссии (Voitovich et al., 2006; Ploskaya-Chaibi et al., 2015).

Кариотип *R. temporaria* состоит из 26 метацентрических и субметацентрических хромосом с ядрышковым организатором (ЯОР), локализованным на 10-й паре хромосом, и характеризуется отсутствием гетероморфизма половых хромосом. Однако в указанных исследованиях есть некоторые разногласия, касающиеся значений центромерных индексов 7—10-й пар хромосом. Различия могут быть вызваны разной степенью конденсации выборок рутинно окрашенных хромосом, взятых в анализ.

В ряде исследований отмечено, что некоторые особи ряда популяций *R. temporaria* могут

иметь дополнительные хромосомы (В-хромосомы) (Wickbom, 1945; Voitovich et al., 2006; Ploskaya-Chaibi et al., 2015). В-хромосомы не являются обязательной частью кариотипа *R. temporaria*, частота встречаемости особей с В-хромосомами варьирует в разных популяциях, а количество В-хромосом может различаться между разными особями и популяциями (Wickbom, 1945; Voitovich et al., 2006; Ploskaya-Chaibi et al., 2015). Наличие В-хромосом может быть связано с адаптацией к экстремальным условиям и специфическими экологическими факторами (Voitovich et al., 2006; Ploskaya-Chaibi et al., 2015). Другим интересным цитогенетическим феноменом, наблюдаемым у *R. temporaria*, является смешанная полиплоидизация (миксоплоидия): в некоторых популяциях обнаружены особи, содержащие в семенниках клетки с тетра- и гексаплоидными наборами хромосом, что может объясняться, по мнению автора, мутагенным воздействием окружающей среды (Манило, 2005).

Метод *in situ* гибридизации (Vitelli et al., 1982) с 3Н 18S + 28S рибосомной РНК (рРНК) и 3Н 5S рРНК, полученной из клеток почек *X. laevis*, был использован для определения локализации рДНК у десяти видов лягушек, включая *R. temporaria*. Согласно этим авторам, гены 5S рДНК у *R. temporaria* локализованы в одном районе, расположенном на коротком плече 7-й хромосомы, близко к центромере, а 45S рДНК у *R. temporaria* локализована в одном районе, соответствующем ЯОР, на хромосоме 10.

Мы проанализировали кариотип *R. temporaria* из Ленинградской области, используя стандартные цитогенетические (рутинное окрашивание и С-бэндинг), молекулярные (флуоресцентная гибридизация *in situ* с использованием зондов к 5S рДНК и повтору S1A) методы и окрашивание флуоресцентными красителями (DAPI, СМА3 и SYBR Green). Эта работа может оказаться полезной для картирования некоторых из предсказанных *in silico* повторяющихся последовательностей на хромосомах и станет еще одним шагом в характеристике кариотипа и генома этого вида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования и получение метафазных хромосом. Лягушек отбирали из естественной среды обитания (Ленинградская область, Всеволожский район, СНТ Бабино-2). Всего для хро-

мосомных исследований было использовано 2 молодых самца и 1 самка *R. temporaria*. Особям вводили внутривентально 0.05 %-ный раствор колхицина (0.1 мл на 10 г общей массы тела) за 24 ч до начала приготовления препаратов хромосом. Из образцов тканей кишечника и семенников готовили суспензии клеток, которые инкубировали в течение 30 мин в гипотоническом растворе KCl 0.075 М, фиксировали в стандартном растворе метанола с уксусной кислотой (3:1). Полученные образцы тканей и клеточных суспензий раскапывали на нагретые на водяной бане предметные стекла и высушивали для получения метафазных пластинок хромосом.

Цитогенетический анализ. Хромосомы обрабатывали в соответствии с протоколом рутинного окрашивания 5 %-ным раствором Гимза («ПАНЭКО», Россия) на 1-кратном фосфатно-солевом буферном растворе (рН 6,8) в течение 10 мин. С-окрашивание хромосом проводили по классическому методу Самнера (Sumner, 1972). Для окрашивания препаратов азотнокислым серебром с целью выявления ЯОР хромосом использовали вариант метода Ag-AS (Goodpasture, Bloom, 1975). Окрашивание препаратов флуоресцентными АТ- и ГЦ-специфичными красителями DAPI (ThermoFisher Scientific, США) и СМА3 (хромомицин А3) соответственно (все от Sigma-Aldrich, США) осуществляли по методу Швейцера (Schweizer, 1980). Для окрашивания двухцепочечным зеленым dsGreen (раствор для окрашивания нуклеиновых кислот в гелях, аналог SYBR Green I) (Lumiprobe, Россия) 10 000-кратный раствор красителя разводили в дистиллированной воде в соотношении 1:50 000 и окрашивали препараты в течение 5 мин в темноте.

Съемку препаратов, окрашенных раствором Гимза, проводили с помощью микроскопа (Axioscope Zeiss, Германия), оснащенного камерой ProgRes® MF (Jenoptik, Германия) и программой Карио3.1 («ВидеоТест», Россия). Препараты, окрашенные флуорохромами, анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскоп LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия), реконструкцию кариотипа, измерение хромосом для определения их относительной длины (отношение длины хромосомы к общей длине гаплоидного набора хромосом, %), подсчет центромерного индекса (отношение длины короткого плеча к общей длине хромосомы) и построение идиограмм хромосом проводили с помощью программы DRAWID (Kirov et al., 2017).

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы GraphPad Prism 8. Хромосомы были классифицированы по номенклатуре Левана с соавторами (Levan et al., 1964). Было проанализировано и кариотипировано не менее 40 метафазных пластинок по 5—7 для каждого метода окрашивания, измерение хромосом для подсчета центромерного индекса и относительной длины хромосом проводили на 10 полных метафазных пластинках.

Зонды для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Геномную ДНК выделяли из печени лягушки по стандартной методике (Feliciello et al., 2005). Повтор S1A амплифицировали с геномной ДНК в термоциклере Mastercycler personal 5332 (Eppendorf, Германия) со следующими праймерами: прямой S1A_F (AACTTGGGGAGCATCTTCCT) и обратный S1A_R (TCCCATGTAAACGGTCCAT) по следующей программе: 95 °C — 2 мин, затем 30 циклов (95 °C — 30 с, 57 °C — 40 с, 72 °C — 40 с) и 72 °C — 5 мин. ПЦР проводили последовательно два раза; во второй раз в качестве матрицы для синтеза цепей ДНК использовали продукт, полученный в ходе первой амплификации; вторую амплификацию проводили в присутствии sulfo-Сyanine3-dUTP (Lumiprobe, Россия). Меченую ДНК осаждали этанолом, высушенный осадок ДНК растворяли в деионизованной воде. Для выявления 5S рДНК использовали зонд ATCATTTCTGAAAGCGCCCGATCT, модифицированный по 5'- и 3'-концам 6-FAM и соответствующий участку аннотированного 5S рДНК гена (ООО «Бигль», Россия).

Метод FISH использовали в соответствии с описанием (Tagarro et al., 1994), но с некоторыми изменениями. Предобработку препаратов и денатурацию ДНК хромосом проводили согласно стандартной методике (Ivanova et al., 2022). Двухцепочечный зонд S1A, растворенный в буфере Hybrisol (Molecular Probes, Eugene, OR, США), денатурировали при 80 °C в течение 7 мин и охлаждали, помещая смесь на лед на 10 мин. Для коммерчески синтезированных одноцепочечных зондов этап денатурации не требовался. Гибридизацию препаратов с зондами проводили в течение 16—18 ч при 37 °C во влажной камере. После гибридизации препараты промывали 3 раза в 2-кратном SSC для одноцепочечного зонда или последовательно в 2-кратном, 1-кратном и 0.5-кратном SSC для двухцепочечного зонда. После отмывки препараты

заклучали в среду Prolong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США), содержащую 1 мкг/мл DAPI для выявления ДНК. Анализ препаратов проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кариотип. Окрашивание препаратов хромосом красителем Гимза показало, что число хромосом в диплоидном наборе равно 26 (рис. 1). Хромосомы четко делятся на 2 группы: 5 пар крупных и 8 пар мелких хромосом. Самые крупные хромосомы 1-й пары представлены метацентриками, к метацентрическим хромосомам также можно отнести пары хромосом 4—6, 8 и 10—12 (табл. 1). Хромосомы 2-й, 3-й, 7-й и 13-й пар являются субметацентрическими. Несмотря на то, что субтелоцентрической является только 9-я пара хромосом, 7-я пара характеризуется более низким значением центромерного индекса (по сравнению с остальными субметацентрическими хромосомами) (табл. 1). Таким образом, формула хромосомного набора, по данным проведенного нами морфометрического анализа, имеет следующий вид: $2n = 16m + 8sm + 2st = 26$.

Таблица 1. Центромерный индекс и относительная длина хромосом (среднее значение $\pm \sigma$)

№	Тип хромосом (Levan et al., 1964)	Центромерный индекс	Относительная длина хромосом, %
1	m	0.46 $\pm$ 0.01	16.68 $\pm$ 0.86
2	sm	0.37 $\pm$ 0.01	13.62 $\pm$ 0.62
3	sm	0.35 $\pm$ 0.03	12.16 $\pm$ 0.61
4	m	0.40 $\pm$ 0.03	11.16 $\pm$ 0.61
5	m	0.42 $\pm$ 0.02	9.66 $\pm$ 0.43
6	m	0.39 $\pm$ 0.04	5.85 $\pm$ 0.44
7	sm	0.28 $\pm$ 0.03	5.52 $\pm$ 0.36
8	m	0.41 $\pm$ 0.03	5.13 $\pm$ 0.33
9	st	0.23 $\pm$ 0.03	4.79 $\pm$ 0.40
10	m	0.42 $\pm$ 0.04	4.42 $\pm$ 0.29
11	m	0.43 $\pm$ 0.04	4.11 $\pm$ 0.28
12	m	0.38 $\pm$ 0.04	3.76 $\pm$ 0.28
13	sm	0.35 $\pm$ 0.05	3.18 $\pm$ 0.31

№ — номер хромосомы; m — метацентрик, sm — субметацентрик, st — субтелоцентрик.

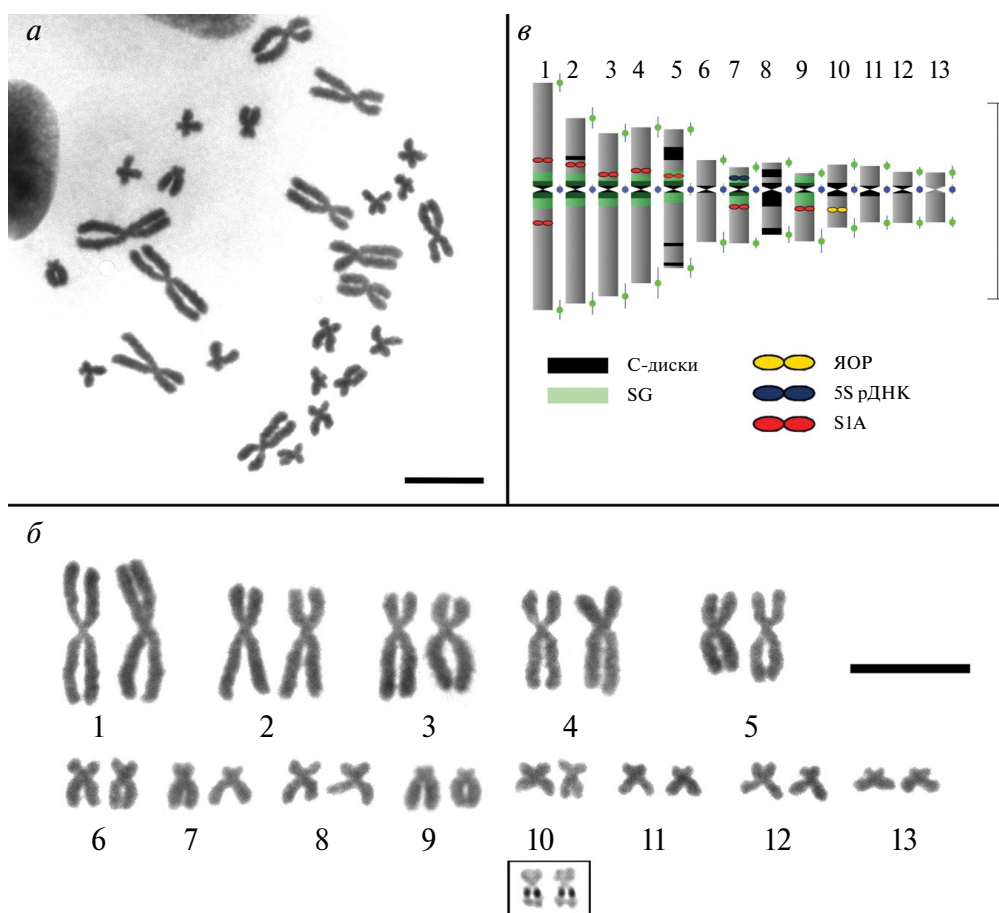


Рис. 1. Хромосомы травяной лягушки *R. temporaria*: *a* — метафазная пластинка после окрашивания красителем Гимза; *б* — кариограмма; хромосомы, несущие ЯОР, показаны внизу на врезке; *в* — идиограмма хромосом травяной лягушки. Масштабная линейка (*a*, *б*): 10 мкм.

На длинном плече в интерстициальном районе 10-й пары хромосом обнаружены симметричные ЯОР, которые выявляются с помощью окрашивания азотнокислым серебром (рис. 1*б*, врезка), а при рутинном окрашивании на большинстве метафазных пластинок выглядят как вторичные перетяжки. Проанализированные нами метафазные пластинки были использованы для построения идиограмм хромосом кариотипа *R. temporaria* и представлены на рис. 1*в*.

Распределение гетерохроматина. С-окрашивание хромосом выявило позитивные гетерохроматиновые блоки, которые выявляются в центромерных районах большинства хромосом (рис. 2*а*). На парах хромосом 2, 5 и 8 обнаруживали дополнительные интерстициальные С-блоки (отмечены на идеограмме хромосом, см. рис. 1*в*), дополнительные С-блоки обнаруживали также в теломерном районе длинного плеча 8-й пары хромосом (см. рис. 1*в*, 2*а*).

Как было показано во многих исследованиях, окрашивание СМАЗ выявляет ГЦ-богатый гетерохроматин, который обычно ассоциируется с областями ЯОР у амфибий (Maug et al., 1986), а флуохром DAPI выявляет АТ-богатые районы хромосом (Schweizer, 1980). Однако в нашей работе окрашивание как DAPI, так и СМАЗ показало в целом равномерную флуоресценцию на всех хромосомах, за исключением единственного DAPI-негативного участка, соответствующего ЯОР, на хромосоме 10 (рис. 2*б*, *в*).

Необычной оказалась окраска флуоресцентным красителем SYBR Green: наблюдали интенсивную флуоресценцию в центромерных районах хромосомных пар 1—5, 7 и 9, а также в меньшей степени 6 и 13 (рис. 2*г*). На коротком плече пар хромосом 1 и 2 обнаруживали дополнительные интерстициальные сигналы. Наличие интерстициальных сигналов зависело от степени конденсации хромосом, и эти сигналы наблюдали не на всех

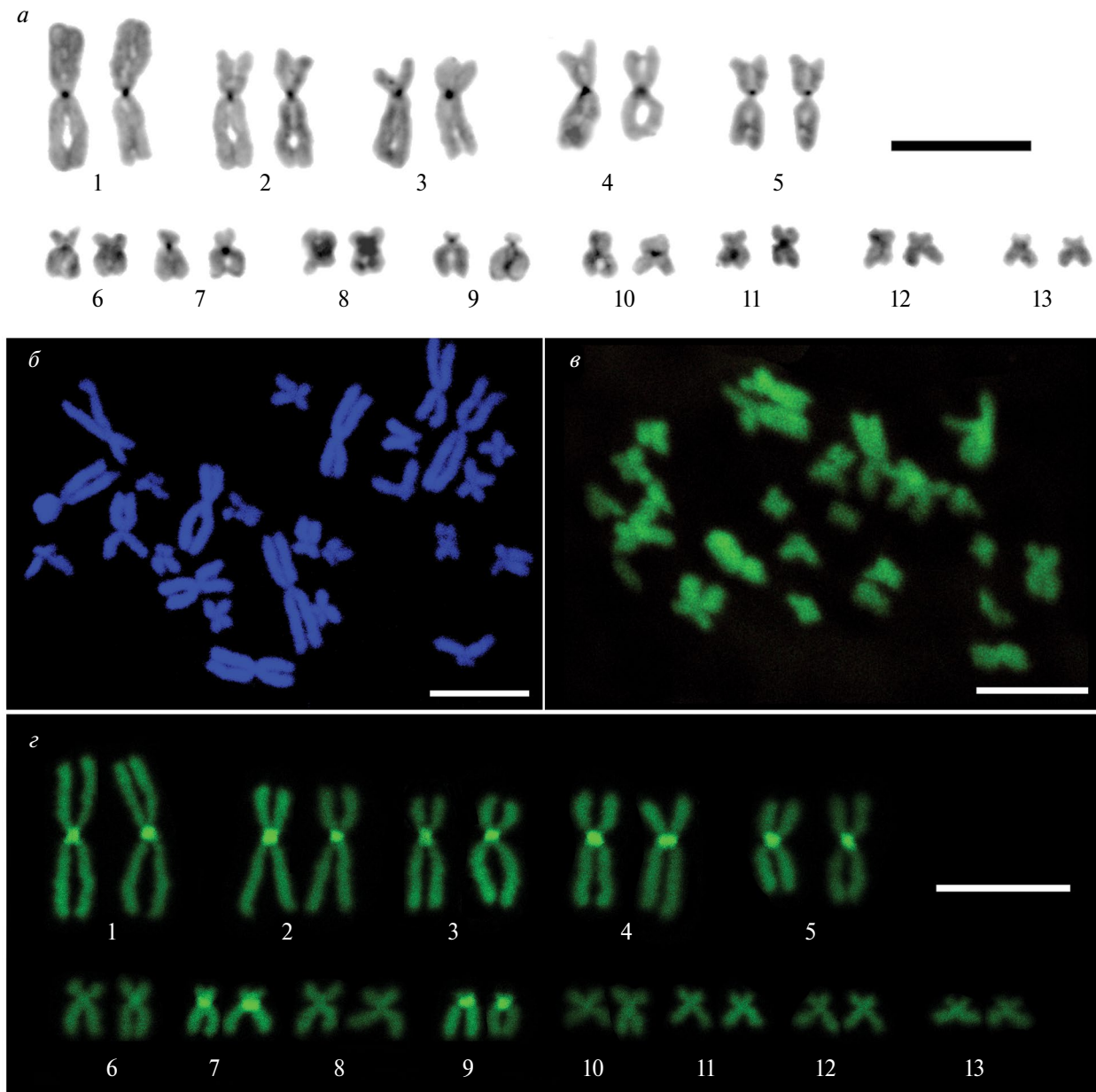


Рис. 2. Дифференциальное окрашивание хромосом: а — С-диски; б — окрашивание DAPI; в — окрашивание СМА3; з — окрашивание SYBR Green. Масштабная линейка: 10 мкм.

метафазных пластинках в отличие от сигналов в центромерных районах.

Локализация повторяющихся последовательностей ДНК. Поскольку ранние цитогенетические исследования выявили единственный участок 5S рДНК с помощью зонда, содержащего потенциально транскрибируемую область 5S рДНК (Vitelli et al., 1982), локализация этого гена была проверена с помощью олигонуклеотида, соответствующего фрагменту аннотированного гена 5S рДНК. Этот зонд 5S рДНК окрашивал единственную 7-ю пару

хромосом (рис. 3а), что согласуется с данными из литературы (Vitelli et al., 1982).

Дополнительно мы картировали ТП-последовательность S1A на хромосомах травяной лягушки. Хотя наличие повтора S1A (но не S1B) в геноме *R. temporaria* было показано с помощью Саузерн-блота и ПЦР-амплификации с последующим секвенированием (Feliciello et al., 2005), картирование его на хромосомах с помощью FISH до сих пор не проводили. Результат FISH с зондом S1A приведен на рис. 3б. Сигналы

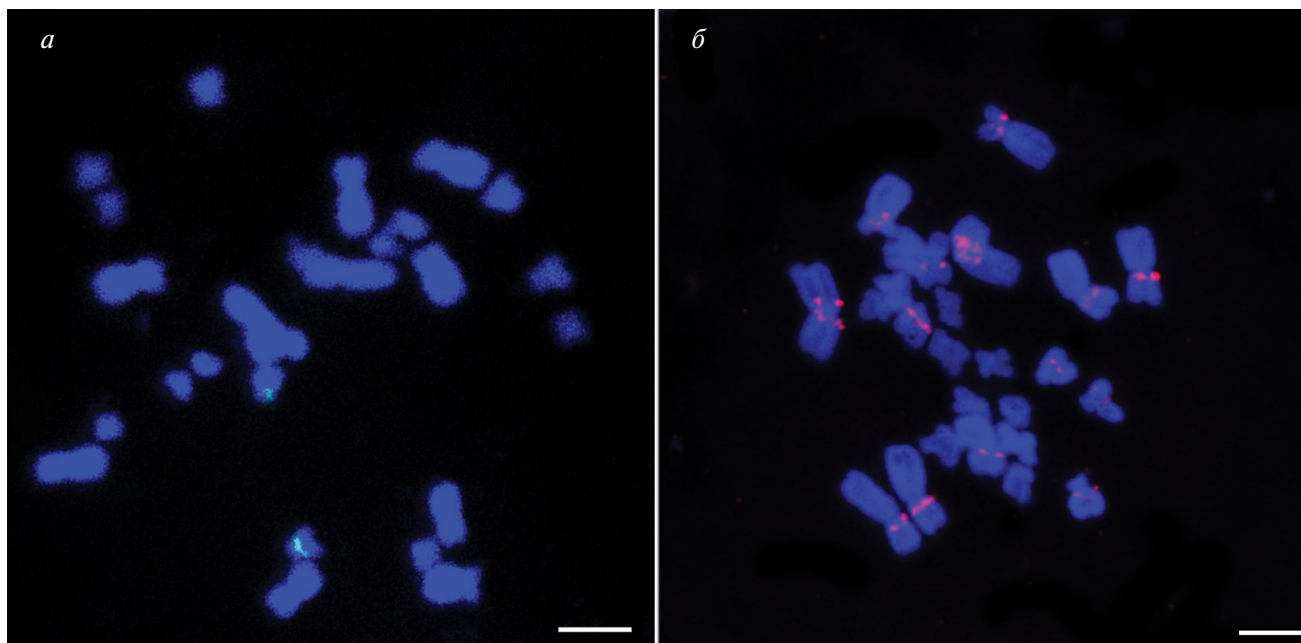


Рис. 3. Метафазная пластинка после использования метода FISH: *а* — с зондом к 5S рДНК (зеленый); *б* — с зондом к повтору S1A (красный). Масштабная линейка: 5 мкм.

располагались на обоих плечах хромосомы 1, на коротких плечах хромосом 2—5 и на длинных плечах хромосом 7 и 9.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе, посвященной окрашиванию хромосом амфибий, Шмид (Schmid, 1978) отмечает, что классические G- и Q-диски, характерные для хромосом млекопитающих, не обнаруживаются на хромосомах амфибий. Это объясняется особенностями организации ДНК в геномах холоднокровных позвоночных [отсутствие длинных гомогенных по составу оснований областей (Schmid et al., 2003)] или сильной конденсацией хромосом (Schmid, 1978; Schempp, Schmid, 1981). У амфибий выявляют C-диски, которые являются важным цитогенетическим маркером: расположение и количество C-дисков могут быть использованы для изучения эволюции, систематики и генетики амфибий (Matsui et al., 1985; Supaprom, Baimai, 2005; Ananias et al., 2007), однако некоторые гетерохроматиновые области могут быть слабо окрашены и не обнаруживаться при использовании стандартного метода C-окрашивания (Schmid et al., 2010). С помощью специальных методов *in vivo* выявляют паттерны репликации ДНК, которые позволяют различать хромосомы и анализировать их структуру.

Была разработана (Schempp, Schmid, 1981) модифицированная техника BrdU—Hoechst—Giemsa. Однако эта методика является довольно трудоемким процессом: сама процедура занимает несколько дней и требует соблюдения условий (обеспечение жизнеспособности амфибий и соблюдение стерильных условий) после введения живым амфибиям ряда токсичных реагентов для получения качественных результатов. RBG-хромосомы (R-диски, BrdU, Giemsa — репликативный метод окраски после введения BrdU) высокого разрешения были получены у нескольких видов лягушек японскими учеными (Nishioka et al., 1993; Miura, 1994, 1995; Kuwana et al., 2021; Miura et al., 2024). Материалом для получения препаратов хромосом в этих работах служили клетки из культуры крови лягушек, а сам метод получения и культивирования клеток был разработан в 1994 г. (Miura, 1994). К сожалению, этот метод не нашел широкого применения в дальнейших исследованиях кариотипов амфибий, и до сих пор кариограммы строят в основном на основе рутинного метода окрашивания красителем Гимза или C-метода. Идентификация хромосом при этом основывается на размерах хромосом и положении центромеры, что не дает гарантии безошибочного построения идиограмм.

Кроме того, используют различные флуоресцентные красители, специфичные к определенным районам хромосом. Например, Шмид (Schmid, 1978,

1980) применял митрамицин, СМАЗ и акрихин для окрашивания хромосом амфибий, что позволило выявить районы ЯОР и некоторые гетерохроматиновые участки. У млекопитающих окрашивание DAPI выявляет полосы G-типа (Q-типа) и богатый АТ гетерохроматин (Schweizer, 1980). У некоторых видов амфибий DAPI также выявляет богатый АТ гетерохроматин, хотя и не дает полос G-типа (Q-типа) (Schmid et al., 1983; Ferro et al., 2018).

В целом данные из литературы и наши описания кариотипа практически совпадают за исключением непринципиальных различий оценки морфологии некоторых хромосом (пары 7—10), вызванных скорее разной степенью спирализации анализируемых хромосом, чем реальными отличиями в кариотипе. Локализация вторичной перетяжки, соответствующей районам ЯОР, которые выявляются с помощью окрашивания азотнокислым серебром (см. рис. 1б, врезка), на длинном плече 10-й пары хромосом совпадает с описанными в литературе данными (Guillemin, 1967; Spasić-Bošković et al., 1997; Манило, 2005) за исключением единственной работы, посвященной описанию кариотипа для популяций из Швеции, в которой вторичная перетяжка была обнаружена на длинном плече хромосомы 2 (Wickbom, 1945).

Полученные нами данные о С-дисках в центромерных районах (см. рис. 2а) совпадают с данными из литературы (Бирштейн, 1981; Spasić-Bošković et al., 1997). Спасич-Бошкович и соавторы выявили большее количество С-полос в интерстициальных и теломерных участках хромосом (Spasić-Bošković et al., 1997). Стоит отметить, что выявленные нами интерстициальные С-полосы на хромосомах 2 и 5 также были обнаружены в указанной работе (Spasić-Bošković et al., 1997). Различия количеств выявляемых в интерстициальных районах С-дисков могут объясняться небольшими методическими различиями. Кроме того, сложности в воспроизведении одних и тех же результатов С-окрашивания на хромосомах *Anura* уже обсуждалось в литературе (например, см. Бирштейн, 1981). Флуорохромы DAPI и СМАЗ оказались малоинформативными в нашем случае (см. рис. 2б, в). На сколько нам известно, ранее другие авторы не окрашивали хромосомы травяной лягушки DAPI и СМАЗ. Возможно, дальнейшая модификация техник окрашивания поможет выявить дополнительные маркеры. Для выявления АТ-богатых участков на хромосомах амфибий также применяется метод окрашивания DAPI с контра-

стированием дистамицином А (Schmid, Steinlein, 2016; Skorinov et al., 2024). Возможно, применение этой техники в дальнейшем позволит нам выявить дополнительные маркеры и на хромосомах травяной лягушки.

SYBR Green — флуоресцентный краситель, который широко используется в молекулярной биологии благодаря своей способности связываться с двухцепочечной ДНК и увеличивать свою флуоресценцию при связывании. SYBR Green является популярным красителем для ПЦР в реальном времени, для визуализации фрагментов ДНК в агарозных гелях, а также применяется (хотя и не является стандартным красителем) для контрастирования ДНК в живых и фиксированных клетках (Briggs, Jones, 2005; Davidian et al., 2021). Несколько исследований показали, что SYBR Green может иметь несколько более высокое сродство к последовательностям, богатым АТ-нуклеотидами (Zipper, 2004; Mao et al., 2007). Это означает, что SYBR Green может флуоресцировать ярче при связывании с последовательностями, богатыми АТ, чем с последовательностями, богатыми ГЦ. Мы впервые использовали SYBR Green для характеристики кариотипа (см. рис. 2г). Некоторые С-диски у *R. temporaria* совпадают по расположению с яркими районами, выявляемыми SYBR Green (см. рис. 2а, г), следовательно некоторые участки конститутивного гетерохроматина могут иметь состав ДНК, богатый АТ нуклеотидами. В связи с трудностями выявления дисков на хромосомах амфибий, впервые использованный нами флуорохром SYBR Green может стать полезным методом для анализа хромосом амфибий.

В отличие от генов, кодирующих 18S, 5.8S и 28S рРНК, которые всегда расположены в ЯОР и специфически окрашиваются азотнокислым серебром, множественные хромосомные копии генов 5S рРНК обычно расположены в совершенно других участках хромосом и не выявляются хромосомными красителями. У амфибий количество локусов 5S рДНК на хромосомах варьирует от двух до 18 на диплоидный набор хромосом (Schmid et al., 2010). У лягушки *R. temporaria* выявлен один локус 5S рДНК, который находится на коротком плече хромосомы 7 (см. рис. 3а), дополнительные минорные сайты не были обнаружены, что согласуется с ранними исследованиями (Vitelli et al., 1982).

Как известно, геномы амфибий содержат значительную долю некодирующей повторяющейся ДНК. К некодирующим повторяющимся после-

довательностям ДНК относятся ТП (сателлиты). Число и локализация ТП-последовательностей S1 отличается у разных видов лягушек рода *Rana*. У *R. temporaria* S1A локализован на обоих плечах хромосомы 1, на коротких плечах хромосом 2—5 и на длинных плечах хромосом 7 и 9 (см. рис. 3б). Подобную картину FISH-сигналов на одном или обоих плечах некоторых пар хромосом после гибридизации с зондом S1 наблюдали и у других видов лягушек рода *Rana*. У *R. graeca* повтор S1A локализован только на четырех парах хромосом в перичентромерной области, у *R. italica* — на всех 13 парах хромосом (Picariello et al., 2002), у *R. pseudodalmatina* и *R. macrocnemis* повтор S1B локализован в перичентромерной области коротких плеч хромосомы 2 (Picariello et al., 2018). Таким образом, распределение S1 по хромосомам амфибий может использоваться как маркер идентификации этих хромосом.

Полученные нами данные о кариотипе травяной лягушки будут в дальнейшем использованы для изучения распределения повторяющихся последовательностей ДНК, идентифицированных в полногеномной сборке (Streicher et al., 2021). Дальнейшие модификации существующих цитогенетических методов и разработка новых, а также увеличение набора используемых флуорохромов и контрастирующих агентов позволят безошибочно идентифицировать хромосомы амфибий и выявлять дополнительные хромосом-специфичные маркеры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность С. Ю. Деминову (Институт цитологии РАН) за методическую помощь. Работа выполнена с использованием оборудования группы конфокальной микроскопии Института цитологии РАН. Авторы выражают благодарность сотрудникам группы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00480).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено комитетом по этике при работе с животными Института цитологии РАН (лицензия F18-00380, протокол N14/23 от 8 августа 2023). В исследовании не использованы исчеза-

ющие или охраняемые виды; все образцы были собраны за пределами охраняемых территорий в России.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бирштейн В. Я. 1981. Особенности дифференциальных окрасок хромосом Anura на примере хромосом некоторых видов *Rana* и *Bufo*. Зоологический журнал. Т. 60. № 2. С. 246. (Birstein V. Y. 1981. Specific differential staining patterns of chromosomes in the Anura, some species of the genera *Rana* and *Bufo* taken as an example. J. Zool. V. 60. No. 2. P. 246.)
- Манило В. В. 2005. Хромосомные нарушения (миксоплоидия) у бурых лягушек (Anura, Amphibia) из некоторых областей Украины. Збірник праць Зоологічного музею. № 37. С. 100. (Manilo V. V. 2005. Chromosomal disorders (mixoploidy) in brown frogs (Anura, Amphibia) from some regions of Ukraine. Collection of works of the Zoological Museum. No. 37. P. 100.)
- Песков В. Н., Коцержинская И. М., Манило В. В., Писанец Е. М. 2004. Морфологическая дифференциация и диагностика бурых лягушек *Rana arvalis*, *R. temporaria* и *R. dalmatina* (Amphibia, Ranidae) с территории Украины. Vestnik zoologii. Т. 38. № 6. С. 29. (Peskov V. N., Kotserzhinskaya I. M., Manilo V. V., Pisanets E. M. 2004. Morphological differentiation and diagnosis of brown frogs *Rana arvalis*, *R. temporaria* and *R. dalmatina* (Amphibia, Ranidae) from the territory of Ukraine. Bull. Zool. V. 38. No. 6. P. 29.)
- Ananias F., Modesto Á. D. S., Celi Mendes S., Felgueiras Napoli M. 2007. Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. Hereditas (London, U. K.). V. 144. P. 206. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0018-0661.02026.x>
- Baldari C. T., Amaldi F. 1977. Length and interspersions of repetitive and non repetitive DNA sequences in four Amphibian species with different genome sizes. Chromosoma. V. 61. P. 359. <https://doi.org/10.1007/BF00288619>
- Birstein V. J. 1984. Localization of NORs in karyotypes of four *Rana* species. Genetica. V. 64. P. 149. <https://doi.org/10.1007/BF00115338>
- Biscotti M. A., Olmo E., Heslop-Harrison J. S. 2015. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. Chromosome Res. V. 23. P. 415.

- <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
- Bogolyubov D. S., Shabelnikov S. V., Travina A. O., Sulatsky M. I., Bogolyubova I. O. 2023. Special nuclear structures in the germinal vesicle of the common frog with emphasis on the so-called karyosphere capsule. *J. Dev. Biol.* V. 11. P. 44.
<https://doi.org/10.3390/jdb11040044>
- Bozzoni I., Beccari E. 1978. Clustered and interspersed repetitive DNA sequences in four amphibian species with different genome size. *Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth.* V. 520. P. 245.
[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90224-1](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90224-1)
- Briggs C., Jones M. 2005. SYBR Green I-induced fluorescence in cultured immune cells: a comparison with acridine orange. *Acta Histochem.* V. 107. P. 301.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2005.06.010>
- Cardone D. E., Feliciello I., Marotta M., Rosati C., Chinali G. 1997. A family of centromeric satellite DNAs from the European brown frog *Rana graeca italica*. *Genome.* V. 40. P. 774–781.
<https://doi.org/10.1139/g97-800>
- Davidian A., Koshel E., Dyomin A., Galkina S., Saifitdinova A., Gaginskaya E. 2021. On some structural and evolutionary aspects of rDNA amplification in oogenesis of *Trachemys scripta* turtles. *Cell Tiss. Res.* V. 383. P. 853.
<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03282-x>
- Feliciello I., Picariello O., Chinali G. 2005. The first characterization of the overall variability of repetitive units in a species reveals unexpected features of satellite DNA. *Gene.* V. 349. P. 153.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.001>
- Ferro J. M., Cardozo D. E., Suárez P., Boeris J. M., Blasco-Zúñiga A., Barbero G., Gomes A., Gazoni T., Costa W., Nagamachi C. Y., Rivera M., Parise-Maltempi P. P., Wiley J. E., Pieczarka J. C., Haddad C. F. B. et al. 2018. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia Anura Hylinae). *PLoS One.* V. 13. Art. ID: e0192861.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192861>
- Flemming W. 1882. *Zellsubstanz, kern und zelltheilung*. Leipzig, Ger.: F.C.W. Vogel.
- Frost D. R. 2024. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.2. <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>
- Goodpasture C., Bloom S. E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma.* V. 53. P. 37.
<https://doi.org/10.1007/BF00329389>
- Gregory T. R. 2025. Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>
- Gruzova M. N., Parfenov V. N. 1977. Ultrastructure of late oocyte nuclei in *Rana temporaria*. *J. Cell Sci.* V. 28. P. 1.
<https://doi.org/10.1242/jcs.28.1.1>
- Guillemin C. 1967. Caryotypes de *Rana temporaria* (L.) et de *Rana dalmatina* (Bonaparte). *Chromosoma.* V. 21. P. 189.
<https://doi.org/10.1007/BF00343644>
- Hellsten U., Harland R. M., Gilchrist M. J., Hendrix D., Jurka J., Kapitonov V., Ovcharenko I., Putnam N. H., Shu S., Taher L., Blitz I. L., Blumberg B., Dichmann D. S., Dubchak I., Amaya E. et al. 2010. The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science.* V. 328. P. 633.
<https://doi.org/10.1126/science.1183670>
- Ilicheva N. V., Pochukalina G. N., Podgornaya O. I. 2019. Actin depolymerization disrupts karyosphere capsule integrity but not residual transcription in late oocytes of the grass frog *Rana temporaria*. *J. Cell. Biochem.* V. 120. P. 15057.
<https://doi.org/10.1002/jcb.28767>
- Iriki S. 1930. Studies on Amphibian chromosomes (I): on the chromosomes of *Hyla arborea japonica* GUENTHER. *Mem. Coll. Sci., Univ. Kyoto, Ser. B.* V. 5. P. 1.
- Ivanova N. G., Kartavtseva I. V., Stefanova V. N., Ostromyshenskii D. I., Podgornaya O. I. 2022. Tandem repeat diversity in two closely related hamster species—the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) and striped hamster (*Cricetulus barabensis*). *Biomed.* V. 10. Art. ID925.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10040925>
- Karanova M. V. 2021. Low-temperature adaptation of the *Rana temporaria gastrocnemius* muscle at the onset of anabiosis. *J. Evol. Biochem. Physiol.* V. 57. P. 252.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021020071>
- Kirov I., Khrustaleva L., Van Laere K., Soloviev A., Meeus S., Romanov D., Fesenko I. 2017. DRAWID: User-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comparative Cytogenetics.* V. 11. P. 747.
<https://doi.org/10.3897/compcytogen.v11i4.20830>
- Kuramoto M. 1972. Karyotypes of the six species of frogs (Genus *Rana*) endemic to the Ryukyu islands. *Caryologia.* V. 25. P. 547.
<https://doi.org/10.1080/00087114.1972.10796509>
- Kuwana C., Fujita H., Tagami M., Matsuo T., Miura I. 2021. Evolution of sex chromosome heteromorphy in geographic populations of the Japanese Tago's brown frog complex. *Cytogenet. Genome Res.* V. 161. P. 23.
<https://doi.org/10.1159/000512964>
- Kwon T. 2017. Amphibase: a new genomic resource for non-model amphibian species. *Genesis.* V. 55. Art. ID: e23010.
<https://doi.org/10.1002/dvg.23010>
- Mao F., Leung W. Y., Xin X. 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol.* V. 7. Art. ID: 76 (2007).
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-76>

- Matsui M., Seto T., Kohsaka Y., Borkin L. J. 1985. Bearing of chromosome C-banding patterns on the classification of Eurasian toads of the *Bufo bufo* complex. *Amphibia—Reptilia*. V. 6. P. 23.
- Mayr B., Rab P., Kalat M. 1986. Localisation of NORs and counterstain-enhanced fluorescence studies in *Salmo gairdneri* and *Salmo trutta* (pisces *Salmonidae*). *Theor. Appl. Genet.* V. 71. P. 703.
<https://doi.org/10.1007/BF00263267>
- Minouchi O., Iriki S. 1931. Studies on amphibian chromosomes (II): on the chromosomes of *Bufo bufo japonicus Schlegelii*. *Mem. Coll. Sci., Univ. Kyoto, Ser. B*. V. 6. P. 39.
- Miura I. 1994. Sex chromosome differentiation in the Japanese brown frog *Rana japonica*. I. Sex-related heteromorphism of the distribution pattern of constitutive heterochromatin in chromosome no.4 of the Wakuya population. *Zool. Sci.* V. 11. P. 797.
- Miura I. 1995. The late replication banding patterns of chromosomes are highly conserved in the genera *Rana*, *Hyla* and *Bufo* (Amphibia: Anura). *Chromosoma*. V. 103. P. 567.
<https://doi.org/10.1007/BF00355322>
- Miura I., Hasegawa Y., Ito M., Ezaz T., Ogata M. 2024. Disruption of sex-linked *sox3* causes ZW female-to-male sex reversal in the Japanese frog *Glandirana rugosa*. *Biomolecules*. V. 14. Art. ID: 1566.
<https://doi.org/10.3390/biom14121566>
- Morescalchi A. 1967. Le relazioni tra il cariotipo di anuri diplasioceli: I. Il corredo cromosomico di alcuni Ranidae. *Caryologia*. V. 20. P. 65.
- Nishioka M., Miura I., Saitoh K. 1993. Sex chromosomes of *Rana rugosa* with special reference to local differences in sex-determining mechanism. *Sci. Report Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.* V. 12. P. 55.
<https://doi.org/10.15027/14532>
- Nishioka M., Okumoro H., Hiroaki U. E. D. A., Ryuzaki M. 1987. Karyotypes of brown frogs distributed in Japan, Korea, Europe and North America. *Sci. Report Lab. Amphibian Biol. Hiroshima Univ.* V. 9. P. 165.
- Picariello O., Feliciello I., Bellinello R., Chinali G. 2002. S1 satellite DNA as a taxonomic marker in brown frogs: molecular evidence that *Rana graeca graeca* and *Rana graeca italica* are different species. *Genome*. V. 45. P. 63.
<https://doi.org/10.1139/g01-125>
- Picariello O., Safaei-Mahroo B., Chinali G. 2018. S1 satellite DNA confirms the species rank of *Rana pseudodalmatina* Eiselt & Schmidtler, 1971. *Salamandra*. V. 54. P. 269.
- Ploskaya-Chaibi M., Voitovich A. M., Novitsky R. V., Boudhad R. 2015. B-chromosome and V-shaped spot asymmetry in the common frog (*Rana temporaria* L.) populations. *C. R. Biol.* V. 338. P. 161.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.12.005>
- Prokofieva A. 1935. On the chromosome morphology of certain amphibia. *Cytologia*. V. 6. P. 148.
<https://doi.org/10.1508/cytologia.6.148>
- Rodrigues N., Betto-Colliard C., Jourdan-Pineau H., Perrin N. 2013. Within-population polymorphism of sex-determination systems in the common frog (*Rana temporaria*). *J. Evol. Biol.* V. 26. P. 1569.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12163>
- Rodrigues N., Vuille Y., Loman J., Perrin N. 2015. Sex-chromosome differentiation and 'sex races' in the common frog (*Rana temporaria*). *Proc. R. Soc. B*. V. 282. Art. ID: 20142726.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2726>
- Rückert J. 1892. Zur Entwicklungsgeschichte des Ovariales bei Selachiern. *Anat. Anz.* V. 7. P. 107.
- Ruthsatz K., Bartels F., Stützer D., Eterovick P. C. 2022. Timing of parental breeding shapes sensitivity to nitrate pollution in the common frog *Rana temporaria*. *J. Therm. Biol.* V. 108. Art. ID: 103296.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103296>
- Schempp W., Schmid M. 1981. Chromosome banding in amphibia: VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. *Chromosoma*. V. 83. P. 697.
<https://doi.org/10.1007/BF00328528>
- Schmid M. 1978. Chromosome banding in Amphibia: I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*. V. 66. P. 361.
<https://doi.org/10.1007/BF00328536>
- Schmid M. 1980. Chromosome banding in amphibia: IV. Differentiation of GC- and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*. V. 77. P. 83.
<https://doi.org/10.1007/BF00292043>
- Schmid M., Haaf T., Geile B., Sims S. 1983. Chromosome banding in Amphibia: VIII. An unusual XY/XX-sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, *Hylidae*). *Chromosoma*. V. 88. P. 69.
<https://doi.org/10.1007/BF00329505>
- Schmid M., Steinlein C., Bogart J. P., Feichtinger W., León P., La Marca E., Diaz L. M., Sanz A., Chen S. H., Hedges S. B. 2010. The chromosomes of terraranan frogs. Insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogen. Genome Res.* V. 130. P. 1.
<https://doi.org/10.1159/000301339>
- Schmid M., Steinlein C. 2016. Chromosome banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. *Cytogenet. Genome Res.* V. 148(2—3). P. 211—226.
<https://doi.org/10.1159/000446298>
- Schmid M., Steinlein C., Haaf T. 2003. Chromosome banding in Amphibia. *Cytogen. Genome Res.* V. 101. P. 54.
<https://doi.org/10.1159/000073419>

- Schultze O. 1887. Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung des Amphibieneies. Z. Wiss. Zool. V. 45. P. 177.
- Schweizer D. 1980. Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA-DA-PI bands) in human chromosomes. Cytogen. Genome Res. V. 27. P. 190.
<https://doi.org/10.1159/000131482>
- Session A. M., Uno Y., Kwon T., Chapman J. A., Toyoda A., Takahashi S., Fukui A., Hikosaka A., Suzuki, A., Kon-do M., Van Heeringen S. J., Quigley I., Heinz S., Ogino H., Ochi H. et al. 2016. Genome evolution in the allo-tetraploid frog *Xenopus laevis*. Nature. V. 538. P. 336.
<https://doi.org/10.1038/nature19840>
- Skorinov D. V., Mizhareva P. S., Pasynkova R. A., Litvin-chuk S. N. 2024. What is the true karyotype of *Bufootes latastii* (Amphibia, Anura, Bufonidae)? Russ. Herpetology. V. 31. P. 265.
<https://doi.org/10.30906/1026-2296-2024-31-5-265-274>
- Spasić-Bošković O., Tanić N., Blagojević J., Vujošević M. 1997. Comparative cytogenetic analysis of European brown frogs: *Rana temporaria*, *R. dalmatina* and *R. graeca*. Caryologia. V. 50. P. 139.
<https://doi.org/10.1080/00087114.1997.10797393>
- Stohler R. 1928. Cytologische Untersuchungen an den Keimdrüsen mitteleuropäischer Kröten (*Bufo viridis* Laur., *B. calamita* Laur., *B. vulgaris* Laur.). Zeits. Zellfors. Mikroskop. Anat. V. 7. P. 400.
- Streich J. W., Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme, Wellcome Sanger Institute Scientific Operations: DNA Pipelines collective, Tree of Life Core Informatics collective, Darwin Tree of Life Consortium. 2021. The genome sequence of the common frog *Rana temporaria* Linnaeus 1758. Wellcome Open Res. V. 6. P. 286.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.17296.1>
- Sumner A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. V. 75. P. 304.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90558-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90558-7)
- Sun Y. B., Xiong Z. J., Xiang X. Y., Liu S. P., Zhou W. W., Tu X. L., Zhong L., Wang L., Wua D. D., Zhang B. L., Zhua, C. L., Yang M. M., Chen H. M., Li F., Zhou L. et al. 2015. Whole-genome sequence of the Tibetan frog *Nanorana parkeri* and the comparative evolution of tetrapod genomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 112. P. E1257.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1501764112>
- Sun Y. B., Zhang Y., Wang K. 2020. Perspectives on studying molecular adaptations of amphibians in the genomic era. Zoological Res. V. 41. P. 351.
<https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.046>
- Supaprom T., Baimai V. 2005. Characterization of C-banded mitotic chromosomes in four species of anuran amphibians from Thailand. Amphibia–Reptilia. V. 26. P. 367.
- Tagarro I., Wiegant J., Raap A. K., Gonzalez-Aguilera J. J., Fernandez-Peralta A. M. 1994. Assignment of human satellite 1 DNA as revealed by fluorescent in situ hybridization with oligonucleotides. Hum. Genet. V. 93. P. 125.
<https://doi.org/10.1007/BF00210595>
- Ullerich F. H. 1967. Weitere Untersuchungen über Chromosomenverhältnisse und DNS-Gehalt bei Anuren (Amphibia). Chromosoma. V. 21. P. 345.
- Vitelli L., Batistoni R., Andronico F., Nardi I., Barsacchi-Pilone G. 1982. Chromosomal localization of 18S + 28S and 5S ribosomal RNA genes in evolutionarily diverse anuran amphibians. Chromosoma. V. 84. P. 475.
<https://doi.org/10.1007/BF00292849>
- Voitovich A. M., Yeliseeva K. G., Afonin V. Y., Novitsky R. V., Kazhura Y. I. 2006. B-Chromosomes in populations of *Rana temporaria* (Amphibia: Anura) from Belarus. Acta Zool. Bulg. V. 58. P. 109.
- Wickbom T. 1945. Cytological studies on Dipnoi, Urodela, Anura, and Emys. Hereditas (London, U. K.). V. 31. P. 241.
- Witschi E. 1922. Vererbung und Zytologie des Geschlechts nach Untersuchungen an Fröschen. Zeitschrift Für Induktive Abstammungs- Und Vererbungslehre. V. 29. P. 31.
<https://doi.org/10.1007/bf01958450>
- Zipper H. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res. V. 32. Art. ID: e103.
<https://doi.org/10.1093/nar/gnh101>

KARYOTYPE OF THE GRASS FROG *RANA TEMPORARIA***A. O. Travina^{1, *}, G. N. Pochukalina¹, O. I. Podgornaya¹, V. N. Stefanova¹**^a *Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064, Russia*^{*} *e-mail: alotra1@yandex.ru*

The article is devoted to the cytogenetic study of one of the model species of amphibians — the grass frog *Rana temporaria*. The aim of the study was to develop a standard karyotype of *R. temporaria*, to identify chromosomal markers and to clarify the genome structure. We analysed the karyotype structure, the heterochromatin distribution and the specific localisation of some repetitive sequences on the chromosomes using different chromosome staining methods, including routine Giemsa staining, C-banding, staining with the fluorescent dyes DAPI, CMA3 and SYBR Green and fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with probes to the 5S rDNA and the S1A tandem repeat. The karyotype of *R. temporaria* consists of 26 chromosomes, (NF = 52) divided into 2 groups: 5 pairs of large chromosomes and 8 pairs of small chromosomes. C-banding revealed heterochromatin blocks in the centromeric regions of most chromosomes, and additional interstitial C-bands were detected on some chromosomes. SYBR Green staining showed intense fluorescence in the centromeric regions of some chromosomes. FISH with a probe to 5S rDNA confirmed the location of this gene on the short arm of chromosome pair 7. FISH mapping of the S1A tandem repeat showed the location of signals on both arms of chromosome 1, the short arms of chromosomes 2–5 and the long arms of chromosomes 7 and 9. Difficulties in detecting G- and Q-bands on amphibian chromosomes are discussed. The data obtained are compared with the results of previous studies and modifications to existing cytogenetic methods are suggested. Both DAPI and CMA3 staining showed a generally uniform fluorescence on all chromosomes, with the exception of a single DAPI-negative site corresponding to the NOR on chromosome 10. SYBR Green could be a useful method for the analysis of amphibian chromosomes, given the difficulties in detecting bands using traditional methods and fluorescent dyes.

Keywords: chromosomes, amphibian, heterochromatin, C-banding, DAPI, CMA3, SYBR Green, nucleolus organiser region NOR, 5S rDNA, tandem repeat S1A