

Печатается по решению Ученого совета ИЭВБ РАН

Редакционная коллегия:

А.Г. Бакиев

В.И. Гаранин

Д.Б. Гелашвили

А.Л. Маленев (ответственный редактор)

О.Л. Носкова (технический редактор)

Гелашвили Д.Б., Исаева И.В. Проблема стандартизации змеиных ядов как сырья для фармацевтической промышленности // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 1. - Тольятти, 1995. - С. 4-9.

Давлятов Я.Д. Видовые и внутривидовые особенности в спектре и свойствах ядов змей // Вопросы герпетологии. - Л.: Наука, 1981. - С. 45-46.

Давлятов Я.Д. Некоторые результаты изучения изменчивости ядов змей // Вопросы герпетологии. - Л.: Наука, 1985. - 65 с.

Кривошеев В.А., Пунько А.С., Салтыкова О.Г. Земноводные и пресмыкающиеся Ульяновской области: Методическое пособие. - Ульяновск: Общественное экологическое представительство «СИМБИОЗ», 2001. - 56 с.

Магдеев Д.В., Бакиев А.Г. Изучение фауны гадюк Самарской области // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 1. - Тольятти, 1995. - С. 38-40.

Маленев А.Л., Бакиев А.Г., Мурзаева С.В. Практическое применение модифицированной сыворотки «Антигюрза» // Вторая конференция герпетологов Поволжья: Тез. докл. - Тольятти, 1999. - С. 36-37.

Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б., Ибрагимов А.К. Ядовитые животные и растения СССР. - М.: Высш. шк., 1990. - 272 с.

Песков А.Н. Степная гадюка в Самарской области: история изучения, распространение и распределение // Самарский край в истории России: Материалы юбил. науч. конф. - Самара, 2001. - С. 276-278.

Пестов М.В., Маннапова Е.И., Ушаков В.А. и др. Амфибии и рептилии Нижегородской области. Материалы к кадастру. - Н. Новгород: Международный Социально-экологический союз, Экоцентр «Дронт», 2001. - 178 с.

Положенцев П.А. Классы пресмыкающиеся и земноводные // Животный мир Среднего Поволжья (полезные и вредные животные). - Куйбышев: Кн. изд-во, 1937. - С. 91-99.

Юшков Р.А., Воронов Г.А. Амфибии и рептилии Пермской области: Предварительный кадастр. - Пермь: Изд-во Перм. ун-та, 1994. - 158 с.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК ГИБРИДОГЕННОГО КОМПЛЕКСА *RANA ESCULENTA* В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

В.В. Логинов, Д.Б. Гелашвили

Нижегородский государственный университет, г. Н.Новгород

В естественных условиях организмы часто подвергаются воздействию различных биотических и абиотических стрессоров.

Антропогенные воздействия, с одной стороны, представляют собой новые параметры среды, с другой – обуславливают антропогенную модификацию уже имеющихся природных факторов и тем самым изменение свойств биологических систем. Опасность антропогенных стрессоров состоит прежде всего в том, что биологические системы – будь то организмы, популяции или биоценозы – недостаточно адаптированы к ним. Антропогенные стрессоры создаются с такой скоростью, что биологические системы часто не успевают активизировать соответствующие адаптационные процессы (Lohs, 1982). Методом обнаружения и определения биологически значимых антропогенных нагрузок на основе реакций на них живых организмов, а также на сообщества служит биоиндикация (Гелашвили, 1995). Живые существа (биообъекты) всегда были для человека индикаторами качества среды обитания. Однако биоиндикация как составная часть биомониторинга оформилась в качестве метода научных исследований лишь в последние десятилетия, когда негативные последствия научно-технического прогресса стали объективной реальностью (Гелашвили и др., 1999). Использование методов, основанных на морфогенетических показателях стабильности развития и цитогенетического гомеостаза являются перспективными в связи с тем, что они отвечают практически всем требованиям методологии биомониторинга. Морфогенетические показатели характеризуют уровень стабильности индивидуального развития как способность к формированию сходного фенотипа при данных условиях среды. Показателем стабильности развития может служить флуктуирующая асимметрия. Флуктуирующая асимметрия представляет собой незначительные ненаправленные отклонения от строгой симметрии и может быть идентифицирована по нормальному распределению относительно нуля различий между сторонами, взятых со знаком (Van Valen, 1962). Этот показатель неоднократно использовался для характеристики гомеостаза развития в условиях средового стресса (Захаров, 1987; Захаров и др., 2000; Захаров, Чубинишвили, 2001; Valentine et al., 1973; Valentine, Soule, 1973; Parsons, 1990, 1992; Clarke, 1992; Pankakoski et al., 1992; Graham et al., 1993a, b; Жданова, Гелашвили, 1997; Ушаков, Образцов, 1999). При анализе морфогенетических показателей стабильности развития можно не только вывести различия между разными популяциями одного вида-индикатора, но и следить за изменениями происходящими в одной и той же популяции. Другим параметром, который может быть использован для характеристики гомеостаза развития является цитогенетический гомеостаз (Ильинских и др., 1986), проявляющийся в поддержании постоянства кариотипа. Охарактеризовать цитогенетический гомеостаз можно при помощи микроядерного теста, суть которого состоит в подсчете частоты клеток с микроядрами (Evans et al., 1959). Причиной возникновения микроядер является нарушение нормальной сегрегации отдельных хромосом при митозе или образование ацентрических хромосомных фрагментов вследствие мутаций. Рядом

экспериментальных работ была показана зависимость частоты клеток с микроядрами от концентрации мутагена и времен экспозиции (Hoofman, de Raat, 1982; Jaylet et al., 1985; Van Hummelen et al., 1989; Scarpato et al., 1990). Была продемонстрирована возможность применения этого метода для биомониторинга (Чубинишвили, 1997).

Земноводные являются консументами нескольких порядков и выполняют роль связующего звена в трофических цепях пресноводных водоемов и экосистем суши, что делает их удобным объектом для оценки антропогенных изменений среды. В летний период 1998 - 2000 гг. были исследованы популяции зеленых лягушек гибридогенного комплекса *Rana esculenta* на территории Нижегородской области: в г.г. Нижнем Новгороде (Щелоковский хутор), в Государственном природном заповеднике (ГПЗ) "Керженский" (пруды близ пос. Черноречье) и памятнике природы федерального значения озере Светлояр (близ с. Владимирское). Известно, что два вида зеленых лягушек *Rana lessonae* и *Rana ridibunda* относятся к гибридогенному комплексу *Rana esculenta*. Работами А.Т. Чубинишвили (1997) показано, что виды данного комплекса могут сравниваться по уровню стабильности развития. В качестве критериев оценки состояния природных популяций амфибий использовали 11 морфогенетических признаков для оценки величины флуктуирующей асимметрии (ФА) по показателю средней частоты асимметричного проявления на признак (Захаров и др., 2000) и цитогенетический – количество микроядер (МЯ) в периферической крови лягушек (Ильинских и др., 1986).

Стабильность развития земноводных определялся по разработанной для них пятибалльной шкале отклонений оценки стабильности развития от условно нормального состояния (1-й балл) до критического (5-й балл) (Захаров и др., 2000). Для корректной оценки уровня стабильности развития необходимы адекватные алгоритмы вычисления интегрального показателя ФА. В качестве возможных алгоритмов вычисления интегрального показателя стабильности развития (\bar{A}) были использованы следующие алгоритмы:

– величина средней частоты асимметричного проявления на признак (Захаров, Чубинишвили, 2001), который в аналитической форме может быть записан в виде выражения

$$\bar{A}_i = \frac{1}{mn} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m a_{ij}; \quad (1)$$

где n – количество признаков, $i=1, \dots, n$; m – количество особей в выборке, $j=1, \dots, m$; a_{ij} – количество объектов в группе, имеющих изучаемый качественный признак;

– сумма абсолютных различий между левой (L) и правой (R) сторонами, нормированная на сумму величин признаков на левой (L) и правой (R) сторонах (Гелашвили и др., 2001 а)

$$\bar{A}_2 = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m |L_{ji} - R_{ji}|}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (L_{ji} + R_{ji})}; \quad (2)$$

– дополнение до единицы функционала $\eta_g[f(x_1, x_2, x_3)]$, представляющего собой свертку (Гелашвили и др., 2001 в; Чупрунов и др., 2001)

$$\eta_g[f(x_1, x_2, x_3)] = \frac{\int_{\Omega} f(x_1, x_2, x_3) f(g(x_1, x_2, x_3)) dx_1 dx_2 dx_3}{\int_{\Omega} (f(x_1, x_2, x_3))^2 dx_1 dx_2 dx_3}, \quad (3)$$

которая в виде конечных сумм может быть представлена, как

$$\bar{A}_3 = 1 - \eta_g[f(x_1, x_2, x_3)] = 1 - \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \frac{2 \sum_{j=1}^m L_i \cdot R_j}{\sum_{j=1}^m (L_i^2 + R_j^2)}. \quad (4)$$

Полученные данные обрабатывались статистически с использованием t – критерия Стьюдента и F-критерий Фишера.

Оценка величины ФА по алгоритму \bar{A}_1 показало, что популяции зеленых лягушек, обитающих на охраняемых территориях в ГПЗ "Керженский" (пруды близ пос. Черноречье) и памятнике природы федерального значения озера Светлояр (близ с. Владимирское), характеризуются высоким уровнем стабильности развития (1-й балл). Напротив, популяции амфибий, приуроченные к рекреационным зонам г. Н.Новгорода (пруды-водохранилища Щелоковского хутора), характеризуются возрастанием величины ФА (стабильность развития оценивается 2-м баллом). Ранее, Ушаков и Образцов (1999), установили увеличение ФА в популяциях зеленых лягушек, обитающих в р. Волосяниха (г. Дзержинск), расположенной в зоне влияния крупных химических предприятий. В табл. 1 приведены обобщенные данные по стабильности развития популяций зеленых лягушек в районах исследований.

Для популяций зеленых лягушек, обитающих на охраняемых территориях в ГПЗ "Керженский" и озера Светлояр были вычислены значения ФА с использованием алгоритмов \bar{A}_2, \bar{A}_3 . С достаточной степенью приближения значения ФА, полученные по одному из алгоритмов, можно преобразовать в величины другого, используя следующие уравнения: $\bar{A}_1 = 0.7685 \bar{A}_2 + 0.0728$ и $\bar{A}_1 = 0.8854 \bar{A}_3 + 0.0336$.

Стабильность развития популяций зеленых лягушек,
обитающих в Нижегородской области в 1998-2000 гг.

Место сбора	Величина показателя стабильности развития		Характеристика стабильности популяций
	Величина ФА	Баллы	
пруды п. Черноречье (ГПЗ "Керженский")	0,36 ± 0,04	1	популяция находится в оптимальных условиях с высоким уровнем стабильности развития
оз. Светлояр	0,33 ± 0,03	1	популяция находится в оптимальных условиях с высоким уровнем стабильности развития
пруды- водохранилища Щелоковского хутора (г.Н. Новгород)	0,53 ± 0,03	2	популяция подвергается антропогенному стрессу, приводящему к незначительным, обратимым нарушениям стабильности развития
р. Волосяниха (г.Дзержинск)*	0,60 ± 0,03	4	популяция находится в кризисном состоянии, процессы нарушения стабильности развития значительны

* - по данным Ушакова, Образцова (1999)

Предложенные линейные (\bar{A}_1, \bar{A}_2) и нелинейные (\bar{A}_3) алгоритмы вычисления интегрального показателя ФА адекватно характеризуют стабильность развития популяций лягушек. Высокая степень корреляции позволяет применять каждый из указанных алгоритмов для оценки качества среды.

Для оценки цитогенетического статуса популяций зеленых лягушек был использован микроядерный тест. Частота МЯ у популяций из ГПЗ "Керженский" и озера Светлояр составляет, соответственно, 2,88 и 2,7 %, что соответствует уровню колебаний спонтанной частоты аберрантных клеток.

Синхронность изменений морфогенетического и цитогенетического показателей свидетельствует о том, что первичная оценка состояния популяций может быть получена при использовании каждого из указанных тестов.

Проведенные исследования показывают, что зеленые лягушки, как биоиндикаторы могут отражать качества среды обитания по показателю стабильности развития как на «квазиэталонных» территориях (Керженский заповедник, оз. Светлояр) так и на антропогенно трансформированных (города Н. Новгород и Дзержинск). Каждый из указанных выше подходов (морфогенетический и цитогенетический) хорошо коррелируют между собой и могут быть взаимозаменяемы при первичной оценке качества среды обитания. Предложенные алгоритмы вычисления интегрального показателя ФА адекватно характеризуют стабильность развития популяций лягушек. Однако для корректной оценки качества среды обитания с помощью морфогенетических и цитогенетических подходов необходимо учитывать региональную специфику, что требует дальнейших исследований.

Литература

Гелашивили Д.Б. Экологические основы биомониторинга // Экологический мониторинг. Ч. 1. - Н.Новгород, 1995. - С. 20-24.

Гелашивили Д.Б., Туманов А.А., Безруков М.Е. и др. Методологические проблемы применения биологических методов в экоаналитике // Журн. аналитич. химии. - 1999. - Т. 54. - № 9. - С. 909-910.

Гелашивили Д.Б., Краснов А.К., Логинов В.В. и др. Методологические и методические аспекты мониторинга здоровья среды государственного природного заповедника «Керженский» // Природа Керженского заповедника. - Н.Новгород, 2001а.

Гелашивили Д.Б., Чурунов Е.В., Радаев А.А. Оценка степени симметрии тест-организмов в биомониторинге наземных и водных экосистем // Междунар. науч. конф. «Малые реки: Современное экологическое состояние, актуальные проблемы». - Тольятти, 2001б. - С. 53.

Жданова Н.П., Гелашивили Д.Б. Анализ стабильности развития лягушек рода *Rana* на антропогенных и заповедных территориях // Проблемы общей биологии и прикладной экологии. - Саратов, 1997. - Вып. 2/3. - С. 52-54.

Захаров В.М. Асимметрия животных (популяционно-феногенетический подход). - М., 1987.

Захаров В.М., Баранов А.С., Борисов В.И. и др. Здоровье среды: Методика оценки. - М., 2000. - С. 44-46.

Захаров В.М., Чубинишвили А.Т. Мониторинг здоровья среды на охраняемых природных территориях. - М., 2001. - 148 с.

Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Ф. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. - Новосибирск, 1986. - 256 с.

Ушаков В.А., Образцов А.А. Оценка стабильности развития популяций зеленых лягушек методом флуктуирующей асимметрии на территории Нижегородской области // Вторая конференция герпетологов Поволжья: Тез. докл. - Тольятти, 1999. - С. 54.

Чубинишвили А.Т. Морфогенетическая и цитогенетическая характеристики природных популяций зеленых лягушек гибридогенного комплекса *Rana esculenta* в естественных условиях и подверженных антропогенному воздействию: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - М., 1997.

Чупрунов Е.В., Гелашвили Д.Б., Радаев А.А. Методы количественной оценки симметричности кристаллических структур для целей биомониторинга // Третья Всерос. науч. конф. «Физические проблемы экологии (Экологическая физика)». - М., 2001. - С. 224-225.

Clarke G.M. Fluctuating asymmetry: A technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin // *Acta Zool. Fennica*. - 1992. - V. 191. - P. 31-35.

Evans H.J., Neary G.J., Williamson F.S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and γ -rays on *Vicia faba* roots and effects of oxygen // *Intern. J. Radiat. Biol.* - 1959. - V. 1. - P. 216-229.

Graham J.H., Emlen J.H., Freeman D.C. Developmental stability and its applications in ecotoxicology // *Ecotoxicology*. - 1993a. - V. 2. - P. 175-184.

Graham J.H., Roe K.E., West T.B. Effects of lead and benzene on the developmental stability of *Drosophila melanogaster* // *Ecotoxicology*. - 1993b. - V. 2. - P. 185-195.

Hoofman R.N., de Raat W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbrypymaca* by ethyl methanesulphoyate // *Mutation Research*. - 1982. - V. 104. - P. 147-152.

Jaylet A., Deparis P., Ferrier V., Grinfield S., Siboulet R. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution // *Mutation Research*. - 1985. - V. 164. - P. 245-257.

Lohs K. Luftverunreinigung als chemischer Stress // *Umwelt-Stress, Wiss. Beitr. Martin-Luther-Univ., Hall-Wittenberg*. - 1982. - V. 35. - P. 16-25.

Pankakoski E., Koivisto I., Hyvarinen H. Reduced developmental stability as an indicator of heavy metal pollution in the common shrew *Sorex araneus* // *Acta Zool. Fennica*. - 1992. - V. 191. - P. 137-144.

Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress // *Biol. Rev.* - 1990. - V. 65. - P. 131-145.

Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: A biological monitor of environmental and genomic stress // *Heredity*. - 1992. - V. 68. - P. 361-364.

Scarpato R., Migliore L., Barale R. The micronucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity // *Mutation Research*. - 1990. - V. 245. - P. 231-237.

Van Hummelen P., Zoll C., Paulussen J., Kirsh-Volders M., Jagelt A. The micronucleus test in *Xenopus*: a new and simple "in vivo" technique for detection of mutagens in fresh water // *Mutagenesis*. - 1989. - V. 4, № 1. - P. 12-16.

Valentine D.W., Soule M., Samollow P. Asymmetry analysis in fishes: A possible statistical indicator of environmental stress // Fish. Bull. - 1973. - V. 71, № 2. - P. 357-370.

Valentine D.W., Soule M. Effect of p'p'-DDT on developmental stability of pectoral fin rays in the grunion *Leurestes tenuis* // Fishery bull. - 1973. - V. 71, № 4. - P. 921-926.

Van Valen L. A study of fluctuating asymmetry // Evolution. - 1962. - V. 16. - P. 125-142.

RANA ESCULENTA – КОМПЛЕКС НА ТЕРРИТОРИИ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Е.И. Маннапова., *М.В. Пестов

*Нижегородское общество охраны амфибий и рептилий
при экоцентре «Дронт», г. Н.Новгород*

**Лаборатория охраны биоразнообразия при экоцентре «Дронт»,
г. Н.Новгород*

В последние десятилетия европейские зеленые лягушки привлекают к себе пристальное внимание исследователей разных стран в качестве модели необычного видообразования среди позвоночных животных. В настоящее время общепринято, что съедобная лягушка (*R. esculenta* Linnaeus, 1758) как вид является результатом гибридизации озерной (*R. ridibunda* Pallas, 1771) и прудовой (*R. lessonae* Camerano, 1882) лягушек.

Все три вида комплекса широко расселены в Центральной и Восточной Европе, ареалы их заметно перекрываются. Распространение съедобной лягушки на территории европейской части России до сих пор изучено явно недостаточно вследствие определенной сложности ее достоверного определения по морфологическим признакам. На территории Нижегородской области первые попытки идентификации этого вида были предприняты нами в 1999 г. В ходе широкомасштабных кадастровых герпетологических исследований в 1999–2000 гг. были получены данные о наличии и видовом составе зеленых лягушек в 200 точках, расположенных во всех 5 природно-территориальных комплексах (ПТК) области.

Идентификация съедобных лягушек проводилась по морфологическим признакам и в ряде случаев была подтверждена с помощью метода проточной ДНК-цитометрии коллегами из ЗИН РАН и Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) – Л.Я. Боркиным, С.Н. Литвинчуком и Ю.М. Розановым.

В результате проведенных исследований было впервые достоверно доказано обитание *R. esculenta* на территории Нижегородской области и выявлено 5 типов популяционных систем – L, R, R-L, L-E, R-L-E, из которых 3 (L, R, R-L) являются наиболее распространенными. Наличие