

На правах рукописи



ЗАКС Михаил Михайлович

**ЭКОЛОГИЯ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК (*Rana esculenta complex*)
ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ
ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ**

Специальность 03.02.08 – экология (биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пенза – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Пензенский государственный университет» на кафедре «Зоология и экология».

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Ермаков Олег Александрович

Официальные оппоненты: **Лада Георгий Аркадьевич**,
доктор биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВПО «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»,
заведующий кафедрой биологии;

Ручин Александр Борисович,
доктор биологических наук, доцент,
ФГБУ «Мордовский государственный природный заповедник имени П.Г. Смидовича», директор.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук», г. Тольятти.

Защита состоится 26 июня 2013 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета ДМ 212.337.02 при Пензенской государственной технологической академии по адресу: 440039, г. Пенза, пр. Байдукова / ул. Гагарина, д. 1а/11, корпус 1, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Пензенская государственная технологическая академия».

Автореферат разослан « » мая 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Яхкинд Михаил Ильич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одно из актуальных и перспективных направлений исследований современной экологии – изучение закономерностей популяционной изменчивости животных под воздействием факторов среды, позволяющее оценить его эволюционные последствия в пространстве и времени. Кроме того, основой стабильного функционирования биосферы является сохранение биологического разнообразия, что определяет необходимость изучения различных групп организмов на региональном уровне. Удобной моделью для подобных исследований являются виды с широкой экологической пластичностью, к числу которых относятся бесхвостые амфибии. До настоящего времени комплексного изучения амфибий с применением как традиционных (морфологических), так и современных (биоакустических и молекулярно-генетических) методов на территории Пензенской области не проводилось. Между тем регион исследования расположен в лесостепной зоне и характеризуется широким диапазоном биотопов, как естественных, так и измененных человеком, что позволяет на примере амфибий решать вопросы, связанные с экологическим прогнозированием и мониторингом.

Комплекс средневропейских зеленых лягушек (*Rana esculenta* complex) является удобным объектом для изучения, так как его представители имеют высокую численность, широкое распространение и характеризуются значительным размахом изменчивости. Комплекс включает в себя три вида, из которых озерная (*R. ridibunda*) и прудовая (*R. lessonae*) лягушки являются обычными «менделевскими» видами, а съедобная (*R. esculenta*) лягушка представляет собой устойчивую гибридную между ними форму с уникальным типом наследования. В целом, комплекс средневропейских зеленых лягушек рассматривается как модель сетчатого (гибридогенного) видообразования (Боркин, Даревский, 1980; Lada et al., 1995).

В эколого-фаунистическом плане батрахофауна Пензенской области изучена явно недостаточно. Сведения о ней представлены лишь в нескольких специальных публикациях, посвященных распространению амфибий (Ермаков и др., 2002), морфологии отдельных видов (Ермаков, Ильина, 1999; 1999а) и фауне амфибий государственного природного заповедника «Приволжская лесостепь» (Павлов, 1999).

Цель работы – эколого-фаунистическая характеристика батрахофауны Пензенской области и комплексное изучение группы зеленых лягушек, обитающих в различных экологических условиях, с использованием морфологических, биоакустических и молекулярно-генетических подходов.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить видовой состав и закономерности распределения амфибий и использовать эти данные для составления кадастра земноводных Пензенской области.

2. Изучить межпопуляционную изменчивость морфологических, биоакустических и молекулярно-генетических признаков зеленых лягушек для наиболее полного выявления таксономического разнообразия комплекса.

3. Оценить состояние популяций зеленых лягушек в различных по антропогенной нагрузке биотопах.

4. Выявить редкие виды амфибий Пензенской области и предложить практические мероприятия по сохранению их разнообразия.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Видовое разнообразие и распределение амфибий на территории Пензенской области зависят от неоднородности природных условий и степени изученности района исследований, что усиливает значение кадастровых работ.

2. Применение комплексного подхода, включающего широкий спектр методов исследования (эколого-фаунистических, морфологических, биоакустических, молекулярно-генетических), повышает эффективность изучения биоразнообразия земноводных путем выявления таксономических группировок, диагностика которых традиционными методами затруднена.

3. Частота проявления морфологических аномалий и уровень генетического полиморфизма в популяциях зеленых лягушек зависит от степени антропогенной трансформации мест обитания.

Научная новизна. Впервые изучено распространение и закономерности распределения батрахофауны в природно-территориальных комплексах (ПТК) Пензенской области. Впервые в Поволжском регионе для изучения группы зеленых лягушек использован комплексный подход, включающий эколого-фаунистические, морфологические, биоакустические и молекулярно-генетические исследования. Обнаружен новый для фауны области вид – съедобная лягушка – и две криптические формы озерной лягушки неясного таксономического уровня. Впервые в Пензенской области обнаружены особи с морфологическими аномалиями и определена частота их встречаемости в трансформированных биотопах. Дана оценка генетического полиморфизма популяций в зависимости от степени антропогенной нагрузки.

Научно-практическая значимость. Данные, изложенные в диссертации, расширяют представления об экологии и распространении земноводных на территории Пензенской области, поэтому могут быть использованы в целях сохранения биоразнообразия. На основании анализа данных по частоте встречаемости морфологических аномалий и уровня генетического полиморфизма можно проводить биоиндикационную оценку степени загрязнения водоемов области. Материалы диссертации, сформулированные в ней научные положения, выводы и результаты могут найти применение в работе природоохранных организаций при оценке состояния естественных биогеоценозов, организации многолетнего биомониторинга, составления региональных кадастров животного мира. Выявленные закономерности межпопуляционной изменчивости земноводных позволяют использовать эти данные в преподавании общеэкологических и зоологических курсов в вузах.

Апробация работы. Материалы работы были представлены на международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина «Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения» (г. Пенза, 2008), экологической конференции молодых ученых Поволжья (г. Тольятти, 2009), 14-й Пушкинской международной школе-конференции молодых ученых

«Биология – наука XXI века» (Пушино, 2010), IV съезде герпетологического общества им. А.М. Никольского (Казань, 2011), всероссийской научно-практической конференции «Региональные кадастры животного и растительного мира и Красные книги» (Тамбов, 2012).

Реализация и внедрение результатов работы. Материалы диссертации используются при выполнении работ по гранту Российского фонда фундаментальных исследований на тему «Изучение современного состояния и разнообразия животного мира лесостепных ландшафтов на примере Пензенской области» (проект № 12-04-97073–р_поволжье_а). Данные диссертационного исследования использованы при экологическом мониторинге зоны защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия (пос. Леонидовка), а также при подготовке второго издания Красной книги Пензенской области. Результаты, полученные в ходе исследования, используются в учебном процессе Пензенского государственного университета при подготовке бакалавров и магистров по направлению 020400 – «Биология».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 3 статьи в изданиях, входящих в перечень ведущих научных журналов ВАК.

Личный вклад автора. Основные результаты, приведенные в диссертации, получены непосредственно самим автором в течение четырёхлетних экспедиционных работ на территории Пензенской области, а также камеральной обработки полученных материалов. Автор лично участвовал в сборе, обработке и анализе материала. В совместных публикациях вклад автора составил 70–100 %.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 122 страницах, состоит из введения, 6 глав, выводов и приложения. Список литературы включает 152 источника, в том числе 65 – на иностранных языках. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 7 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. АМФИБИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ И КОМПЛЕКС ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК (*RANA ESCULENTA* COMPLEX) КАК МОДЕЛЬНАЯ ГРУППА ЭКОЛОГИЧЕСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой части главы приведены сведения об истории изучения земноводных, систематическом положении и состоянии изученности комплекса *Rana esculenta*. Во второй части дана всесторонняя характеристика трех видов комплекса, освещены вопросы таксономии, распространения, экологии, а также использования земноводных для биоиндикации состояния окружающей среды. В третьей части дана краткая физико-географическая характеристика региона исследования. В четвертой части приводятся данные об изучении этой группы животных на территории Поволжья и Пензенской области, показана меньшая степень ее изученности по сравнению с соседними регионами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились в период 2009–2012 гг. Отлов животных осуществлялся с берега водоема при помощи рыболовного подсачека. После поимки животные помещались в мешок из хлопчатобумажной ткани с влажной травой на дне, где содержались не более трех часов для проведения измерений и прижизненного отбора проб ДНК, после чего выпускались в водоем. Особи с морфологическими аномалиями фиксировались в 4 % растворе формальдегида для проведения дальнейших исследований.

2.1. Кадастровые исследования. Анализировались оригинальные точки находок амфибий, устные сообщения и литературные сведения. Координаты находок определялись при помощи Интернет-сервиса Google.карты с использованием программы SAS. Планета (<http://sasgis.ru>). Составлены 11 карт, включающих известные места находок каждого вида. Всего учтено 204 точки. Для анализа изученности батрахофауны региона и ее территориального распределения использована карта области, разбитая на квадратные выделы размером 20×20 км с указанием количества видов в каждом. Для ее создания применялся IDW-интерполятор, рассчитывающий регулярную поверхность, с использованием пространственных взаимоотношений случайно распределенных данных (программа MapInfo Professional v. 9.5).

2.2. Морфологический анализ. Измерения морфологических параметров производились непосредственно после поимки животных, на берегу водоема. Фиксировались следующие показатели: длина тела (L), длина головы (Lc), расстояние между глазами (S_{пос}), длина глаза (L_о), ширина головы (L_{тс}), длина бедра (F), длина голени (T), длина первого пальца задней конечности (D_р), длина внутреннего пяточного бугра (C_и), длина плюсны (дополнительной голени) (C_с) (Тарашук, 1989). Полученные данные использовались для расчета относительных показателей – индексов пропорциональности: L/L_{тс}, L/T, L/C_и, D_р/C_и, T/C_и, L_{тс}/C_и, L/L_с, L/S_{пос}, L/F, L/D_р, L/C_с, F/T, I_х (индекс Тарашука). Для дальнейшего анализа использовались относительные показатели, нивелирующие влияние возрастной изменчивости. Всего было проанализировано 268 особей из 16 локалитетов.

При обнаружении особей с отклонениями в развитии производилась макросъемка аномального участка тела, а в случае полидактилии готовился скелетный препарат методом химической мацерации в 6 % растворе КОН с добавлением ализарина. Частота отмеченных аномалий подсчитывалась как отношение количества особей с аномалиями к общему количеству особей, отловленных в данной популяции.

2.3. Биоакустический анализ. Звуковые сигналы записывались в полевых условиях, при температуре воды 21–23 °С. Фиксировались как индивидуальные, так и хоровые крики. В последнем случае отдельные звуки вырезались из общего хора с помощью программы Sound Forge 6.0. Для записи использовали магнитофон «SONY TC-D5M» и микрофон «ВВК DM-100», а также mp3-плеер Samsung YP-U3. Запись производилась с берега водоема, микрофон располагался на расстоянии 0,5–1,5 м от животных. Частотные и временные характеристики сигналов получены с помощью программы SpectraLab 4.32.11 for Win.

Для каждого звука измеряли общую длительность в миллисекундах (мс), промежуток между пиками (мс), количество пульсов, доминантную частоту в начале сигнала (Гц), доминантную частоту в конце сигнала (Гц), максимальную доминантную частоту сигнала (Гц) и амплитуду сигнала (Гц). Таким образом, для каждого звука измеряли 7 параметров (Lode, 2001). Там, где точное снятие показателей было затруднено, оно проводилось с использованием трехкратной повторности с последующим вычислением среднего арифметического. Была записана и проанализирована 141 серия звуков из 11 локалитетов. Для сравнения также использовались записи звуковых сигналов из популяций зеленых лягушек Германии (диск *Heimische Froschlurche, Rufe zur Paarungszeit*).

2.4. Молекулярно-генетический анализ. В качестве образцов тканей для выделения ДНК использовалась часть пальца передней конечности амфибий, взятая прижизненно и зафиксированная в 96 % этаноле. Выделение ДНК осуществляли по стандартной методике фенолхлороформной экстракции с предварительной обработкой протеиназой K и SDS (Sambrook et al., 1989).

Для выявления разнообразия митохондриальных гаплотипов в исследуемых популяциях использовали метод ДНК-штрихкодирования (Ratnasingham, Hebert, 2007), основанный на определении нуклеотидной последовательности фрагмента митохондриального гена цитохром оксидазы (первая субъединица – COI) длиной 600 пар нуклеотидов (пн) при использовании универсальных праймеров VUTF и VUTR (Ivanova et al., 2007). Секвенирование фрагмента гена COI для 27 экз. из разных точек проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Для реконструкции филогенетических отношений использовали метод максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011).

Для видовой диагностики и определения генетического полиморфизма у 62 экз. лягушек использовали два метода анализа ядерной ДНК – RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) и ISSR (Inter-Simple-Sequence-Repeats), основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, имеющими множественную локализацию в геноме (Сулимова, 2004; Wolfe, 2005). Суть методов заключается в амплификации фрагментов ДНК с использованием одного короткого праймера, который связывается с геномной ДНК в двух различных участках инвертированных повторов. При электрофорезе ПЦР-продуктов образуются дискретные фрагменты (ДНК-паттерны), размер которых варьирует от 100 до 1500 пар нуклеотидов. Статистический анализ включал составление бинарных матриц, в которых отмечалось «присутствие» (1) или «отсутствие» (0) фрагментов с одинаковой молекулярной массой на электрофореграмме.

Для статистической обработки результатов применялись: стандартные статистические параметры (*min-max*, среднее арифметическое (M), ошибка среднего (m), стандартное квадратичное отклонение (SD)), при парном сравнении среднеарифметических показателей – параметрический *t*-критерий Стьюдента, при поиске дифференцирующих различий между двумя и более группами по комплексу признаков – дискриминантный анализ. Для всех статистических те-

стов был установлен уровень значимости 0,05. Статистическая обработка данных проведена в пакетах Microsoft Office Excel 2010 и STATISTICA 6.0.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АМФИБИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

На территории Пензенской области достоверно зарегистрировано обитание 11 видов амфибий, два из которых относятся к отряду хвостатых (Caudata): гребенчатый тритон *Triturus cristatus* (Laurenti, 1768), обыкновенный тритон *Lissotriton vulgaris* (Linnaeus, 1758) и девять – к отряду бесхвостых (Anura): краснобрюхая жерлянка *Bombina bombina* (Linnaeus, 1761), обыкновенная чесночница *Pelobates fuscus* (Laurenti, 1768), серая жаба *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758), зеленая жаба *B. viridis* Laurenti, 1768, озерная лягушка *Rana ridibunda* Pallas, 1771, прудовая лягушка *R. lessonae* Cramerano, 1882, съедобная лягушка *R. esculenta* Linnaeus, 1758, травяная лягушка *R. temporaria* Linnaeus, 1758, остромордая лягушка *R. arvalis* Nilsson, 1842. В диссертации для каждого вида приводятся краткий очерк и аннотированная карта распространения, по образцу, приведенному ниже.

Озерная лягушка – *Rana ridibunda* Pallas, 1771 (рис. 1). Синонимы: *Rana esculenta* Linnaeus, 1758; *Bufo ridibundus* Schneider, 1799.

Широко распространенный, местами многочисленный вид Пензенской области, чаще встречающийся в открытых ландшафтах – водоемах, имеющих связь с речными долинами. В подходящих местах обитания может быть встречен практически повсеместно. Отмечен в 42 точках по всей территории области. Численность высокая – от 10 до 80 особей на 200 м береговой линии.

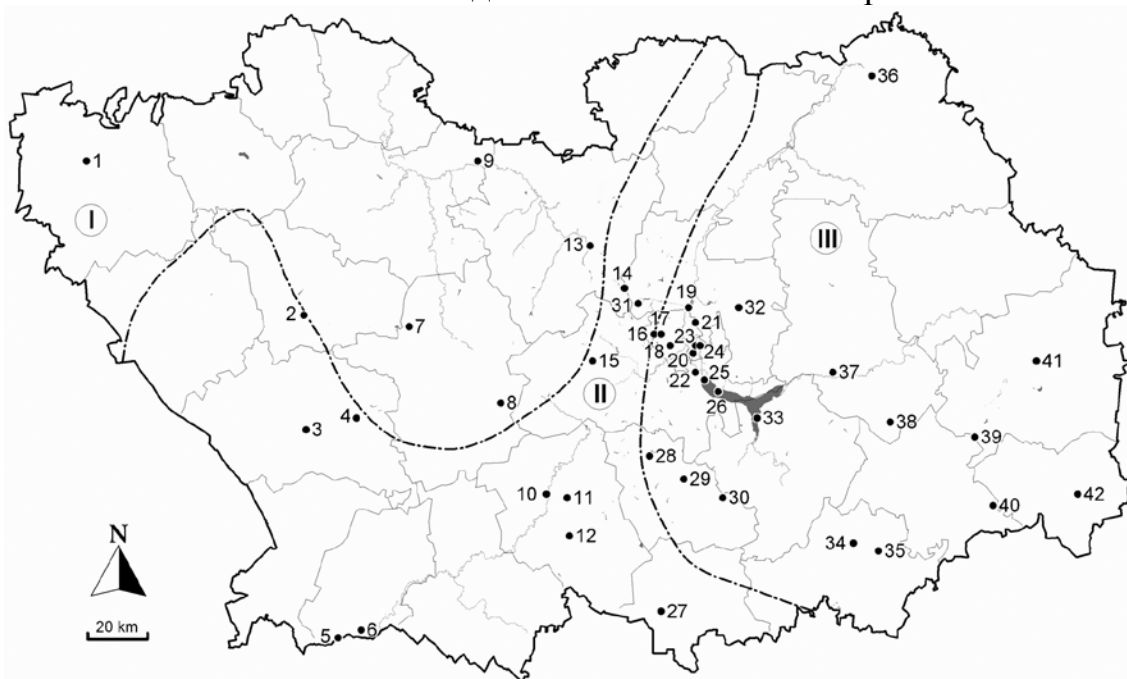


Рис. 1. Распространение озерной лягушки (*Rana ridibunda*) в Пензенской области:
Земетчинский р-н: 1 – окр. с. Пашково, 2001 (53°39' с.ш. 42°25' в.д.) ... Неверкинский р-н: 42 –
окр. с. Неверкино, Неверкинское лесничество, 2001 (52°47' с.ш. 46°45' в.д.)

В Пензенской области на основе зоогеографического районирования (Денисов и др., 1998) выделяют три природно-территориальных участка: Вадин-

ский (I), Хоперский (II) и Сурский (III) (см. рис. 1). Два из них – Вадинский и Сурский – относятся к Европейской лесной провинции, один – Хоперский – к Степной провинции. По числу видов амфибий участки практически не различаются (10–11 видов), однако совокупности экологических факторов каждого участка приводят к неравномерному распределению видов на них (рис. 2). Максимальное число мест находок земноводных (128 точек, 63 %) – в наиболее облесенном и обводненном Сурском участке. В Вадинском и Хоперском участках общее количество точек находок одинаково (по 38 точек, по 18,5 %). Однако Вадинский участок характеризуется более равномерным обнаружением разных видов, что может быть связано с более однородным распределением по территории биотопов, пригодных для обитания амфибий. В Хоперском участке, расположенном в зоне с преобладанием открытых биотопов, наблюдается доминирование двух видов: озерной лягушки – относительно независимого от лесных биотопов вида – и остромордой лягушки – засухоустойчивого вида, который может комфортно обитать в степной зоне.

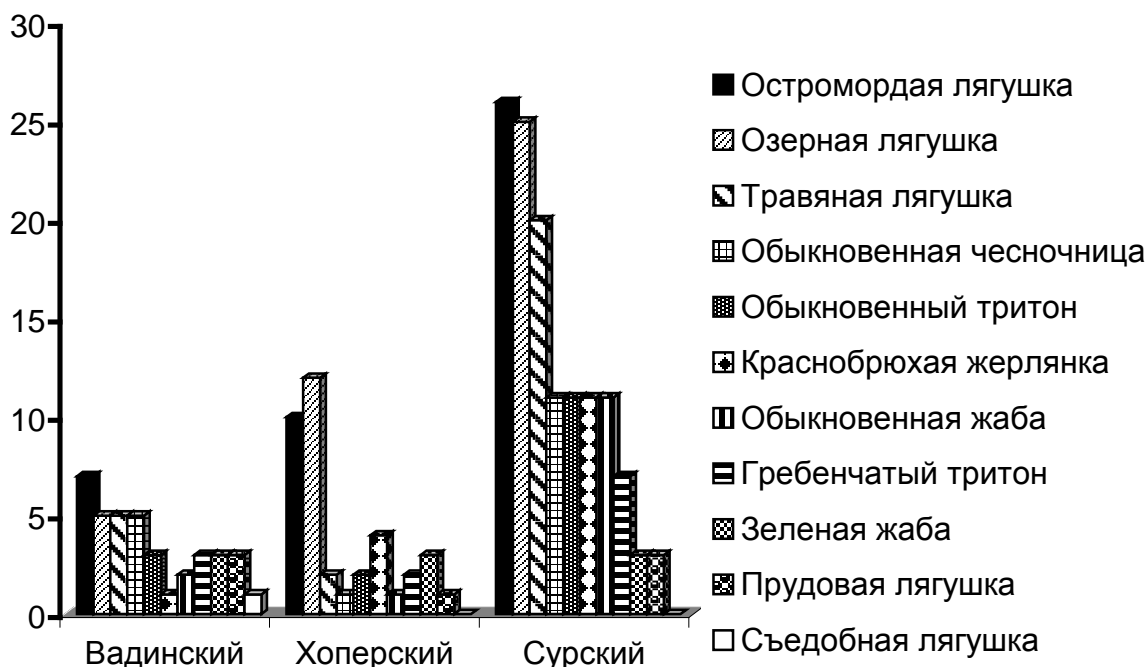


Рис. 2. Соотношение числа мест находок (ось ординат) амфибий в трех природно-территориальных участках Пензенской области

Территориальное распределение видового богатства батрахофауны региона показано на рис. 3. Видно, что крайние западные, центральные и восточные части области по сравнению с периферийными районами (юго-западными, юго-и северо-восточными) отличаются большим числом видов. Такой характер распределения также может быть связан и со степенью изученности региона, так как районы максимального видового богатства совпадают с местами проведения регулярных исследований (окрестности г. Пензы, стационары ПГУ, участки ГПЗ «Приволжская лесостепь») и, соответственно, наибольшим объемом кадастровой информации.

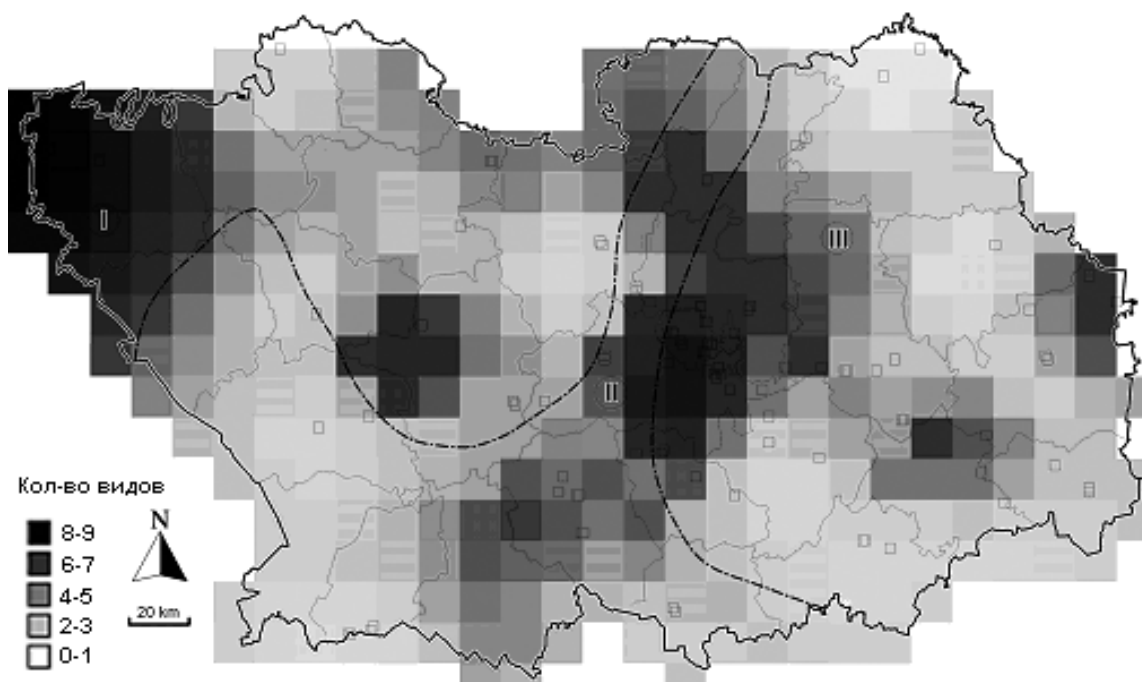


Рис. 3. Распределение числа видов земноводных на территории Пензенской области по квадратным выделам 20×20 км (IDW-интерполяция)

Таким образом, распределение амфибий по территории Пензенской области соответствует их биотопической приуроченности и степени изученности района исследований.

ГЛАВА 4. ГИБРИДОГЕННЫЙ ВИД – СЪЕДОБНАЯ ЛЯГУШКА И КРИПТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ОЗЕРНОЙ ЛЯГУШКИ – «ЗАПАДНАЯ» И «ВОСТОЧНАЯ»: КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ

«Необходимость охраны природы не вызывает сомнений, но природоохранная деятельность предполагает предварительное каталогизирование этой природы» (Шнеер, 2009; с. 296). Применение молекулярно-генетических методов, в том числе ДНК-штрихкодирования (Ratnasingham, Hebert, 2007) значительно ускоряет процесс инвентаризации живого мира. Однако для объективного изучения биоразнообразия необходим комплексный подход, включающий широкий спектр методов. Особенно это касается земноводных, которые, в отличие от других классов позвоночных животных, имеют незначительное количество внешних признаков для идентификации видов (Боркин и др., 2004). В главе рассматриваются результаты анализа морфологических, биоакустических и молекулярно-генетических признаков зеленых лягушек, проведенного с целью обнаружения на территории области таксономических форм, диагностика которых традиционными методами затруднена, что может привести к занижению уровня реального биоразнообразия и, соответственно, к ошибочной стратегии охраны.

4.1. Обнаружение съедобной лягушки (*Rana esculenta* L., 1758) в Пензенской области. Съедобная лягушка (*R. esculenta*) – вид гибридного происхождения, широко распространенный в Центральной, Восточной Европе, на западе и в центре Русской равнины (Лада и др., 2011). В соседних с Пензенской областью регионах – Тамбовской и Ульяновской областях, республиках Мор-

довия и Чувашия – известны достоверные находки вида, однако на территории Пензенской области обитание съедобной лягушки лишь предполагалось, но не было подтверждено генетическими методами.

Изучена выборка зеленых лягушек, взятая в окрестностях нежилого пос. Александровка Земетчинского р-на (53°40'с.ш.; 42°12'в.д.) и предварительно определенная как «прудовая лягушка». Для сравнения, в качестве «модельных», использовались выборки прудовой и озерной лягушек, морфологические и биоакустические показатели которых были изучены нами ранее (Закс, 2008, 2012а, б).

Морфологический анализ показал, что по пяти индексам (L/Ci, Dp/Ci, T/Ci, Ltc/Ci, Ix) экземпляры из выборки «Земетчино» не имели достоверных отличий от прудовой лягушки, по двум (L/Ltc, L/Cs) – напротив, от озерной лягушки. Два индекса (L/T, F/T) оказались промежуточными, а один (L/Lc) достоверно отделял исследуемую выборку от двух «модельных». По средним показателям пропорциональности характерными чертами экземпляров из выборки «Земетчино» являются относительно крупная голова и относительно длинный внутренний пяточный бугор. Мозаичность морфологических признаков выборки подтверждается дискриминантным анализом (табл. 1, рис. 4). Наибольший вклад в диагностику видов вносят факторы пропорциональности задней конечности, пяточного бугра и относительные размеры головы. Эллипсы рассеивания не перекрываются у «модельных» выборок, тогда как эллипс выборки «Земетчино» занимает промежуточное положение, образуя зоны перекрывания.

Таблица 1. Результаты дискриминантного анализа по индексам пропорциональности трех выборок зеленых лягушек

| Признак | Факторные нагрузки | |
|------------------|--------------------|------|
| | DF1 | DF2 |
| L/T | 0,70 | 0,36 |
| T/Ci | -0,59 | 0,53 |
| F/T | 0,53 | 0,27 |
| L/Ci | -0,33 | 0,57 |
| L/Ltc | 0,07 | 0,23 |
| L/Lc | 0,18 | 0,59 |
| Кум. (%) | 86 | 14 |
| χ^2 | 143,5 | 39,4 |
| λ Уилкса | 0,05 | 0,44 |

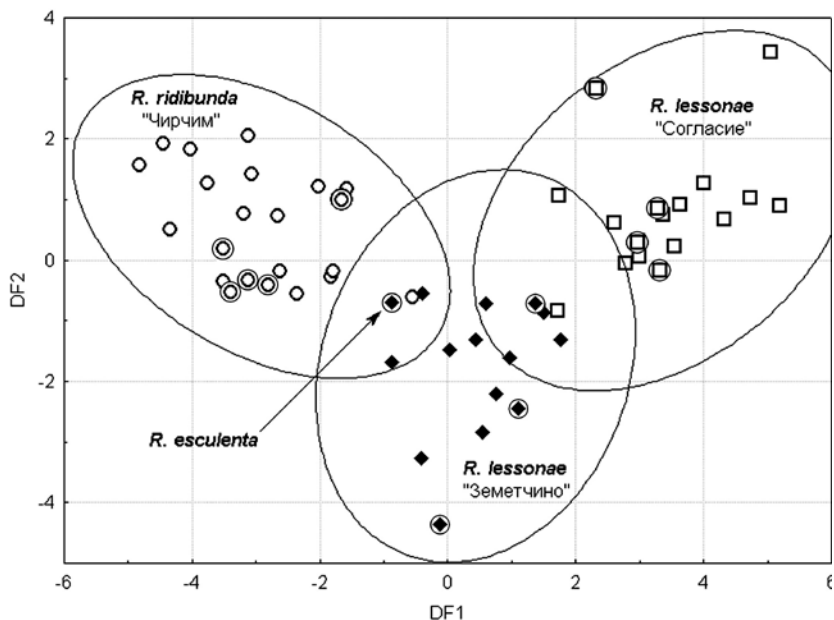


Рис. 4. Размещение значений индексов пропорциональности лягушек из трех выборок в пространстве двух дискриминантных функций. Круглой обводкой выделены экземпляры, для которых проведен молекулярно-генетический анализ

Сложная картина изменчивости морфологических признаков выборки позволила нам предположить наличие среди исследованных экземпляров съедоб-

ной лягушки. Однако известно, что к определению видов комплекса *Rana esculenta* только с помощью морфометрии надо относиться с большой осторожностью (Борисовский и др., 2000). Поэтому был проведен молекулярно-генетический анализ с использованием ISSR-метода. Паттерны всех экземпляров из «модельных» выборок оказались видоспецифичными, однако одна из четырех особей выборки «Земетчино» имела гибридное происхождение, т.е. оказалась съедобной лягушкой. Гибридный экземпляр наследует 5 из 11 фрагментов, специфичных для *R. ridibunda*, и 8 из 10 фрагментов, специфичных для *R. lessonae* (рис. 5). Причем эти данные коррелируют с результатами морфологического анализа, где у особей из выборки «Земетчино» также отмечено некоторое преобладание признаков прудовой лягушки.

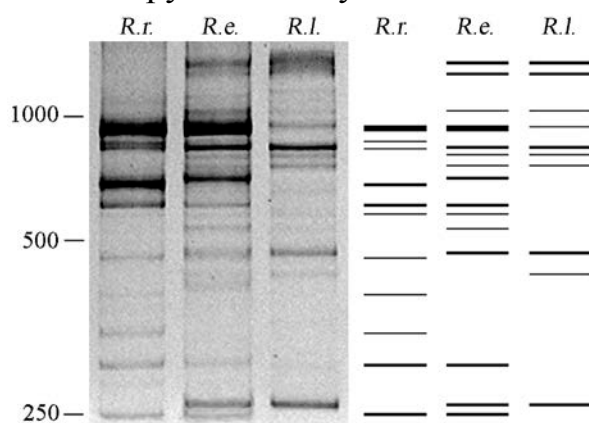


Рис. 5. Электрофореграмма и схема паттернов ПЦР-фрагментов ядерной ДНК, полученных при ISSR-анализе с праймером (AG)₈G (*R.r.* – озерная, *R.e.* – съедобная, *R.l.* – прудовая лягушка). Размеры фрагментов в парах нуклеотидов указаны слева

Таким образом, результаты комплексного анализа позволили доказать обитание на территории Пензенской области съедобной лягушки, и отнести изученную популяционную систему к *LE*-типу (смешанные популяционные системы из *R. lessonae* и *R. esculenta*). Учитывая относительную редкость прудовой лягушки в нашем регионе, ее биотопическую приуроченность и находки в соседних областях, дальнейшее обнаружение вида возможно в северо-западных и восточных облесенных районах области.

4.2. Криптические формы озерной лягушки – диагностика и распространение в Пензенской области. Еще недавно было общепринято, что озерная лягушка обитает на огромной территории от северо-западной Африки до восточного Казахстана. Однако исследования последнего десятилетия показали, что под этим названием скрывается целый «букет» морфологически сходных видов (Боркин и др., 2004; Plotner et al., 2010). В Западной Европе уже различают 9–10 отдельных видов, ранее относимых к *R. ridibunda* (Боркин, 1998). На территории бывшего СССР этот комплекс изучен гораздо слабее, но по ряду различий физиологических и биохимических параметров были выделены две формы – «западная» и «восточная», уровень различий между которыми, возможно, соответствует видовому.

В ходе наших исследований обнаружено, что и на территории Пензенской области популяции *R. ridibunda* из различных локалитетов сильно различаются.

Многофакторный анализ морфологических признаков (рис. 6) и параметров звукового сигнала (рис. 7) показал, что озерные лягушки распадаются на две обособленные группы, одна из которых характеризуется относительно короткими дистальными отделами задних конечностей и меньшей длительностью криков и интервалов между ними, а другая – большими значениями этих параметров.

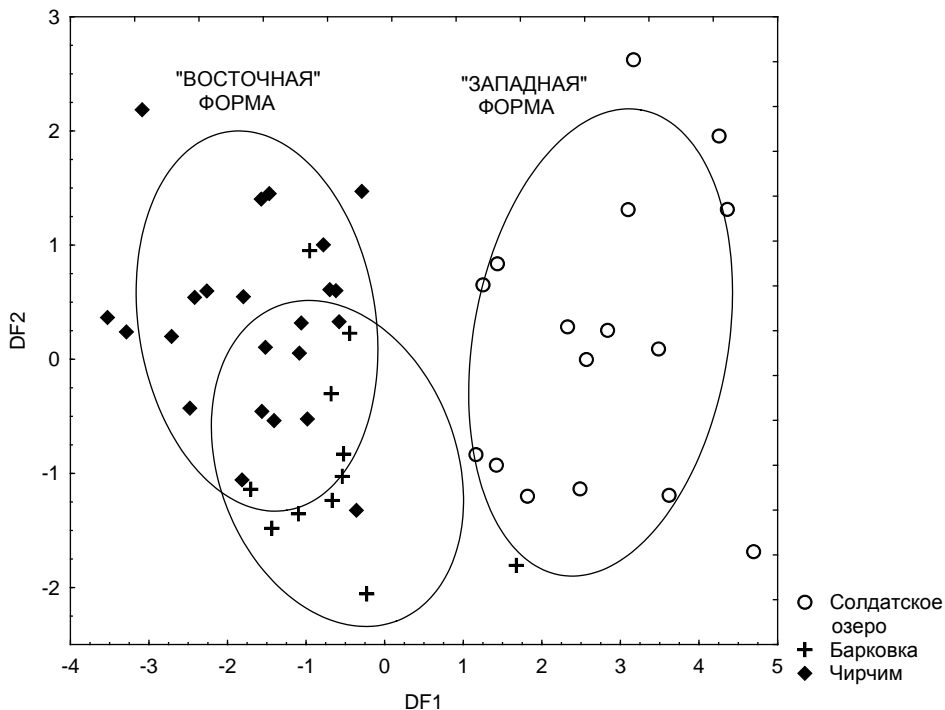


Рис. 6. Распределение морфометрических индексов озерной лягушки из трех популяций в пространстве двух дискриминантных функций

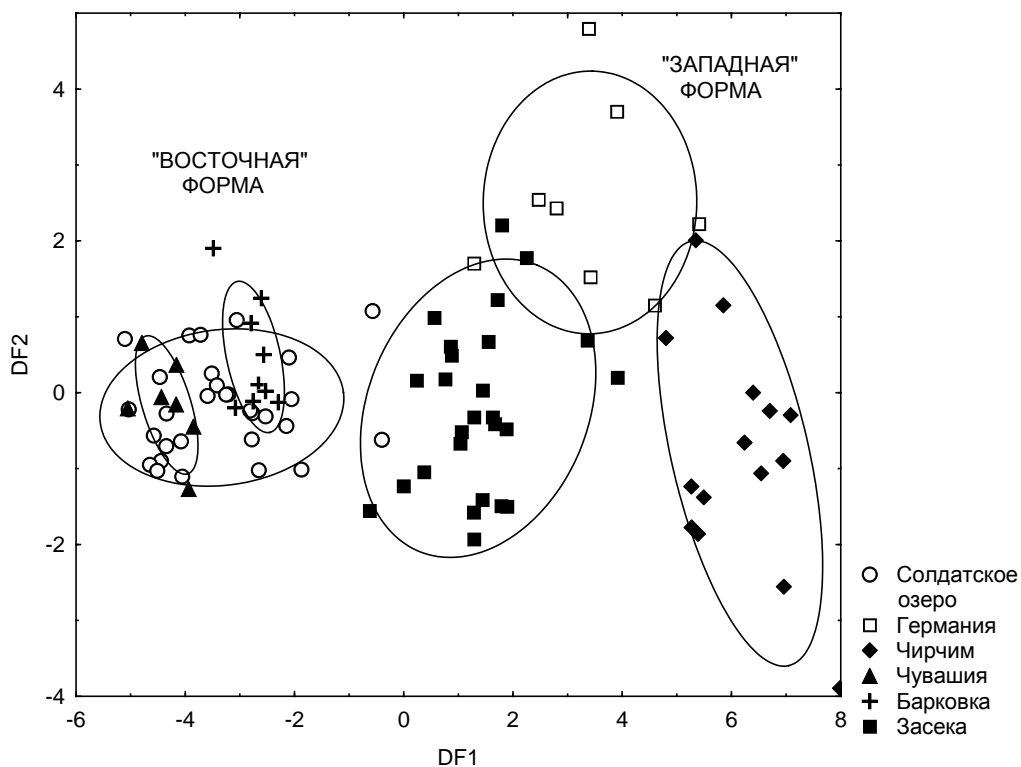


Рис. 7. Распределение параметров звуковых сигналов озерной лягушки из шести популяций в пространстве двух первых дискриминантных функций

По данным проведенного нами молекулярно-генетического анализа (ДНК-штрихкодирование), различия между двумя формами озерных лягушек составили 5,2% нуклеотидных замен, что практически соответствует видовому уровню. На приведенной кладограмме (рис. 8) формы образуют два четко обособленных и статистически поддержанных кластера.

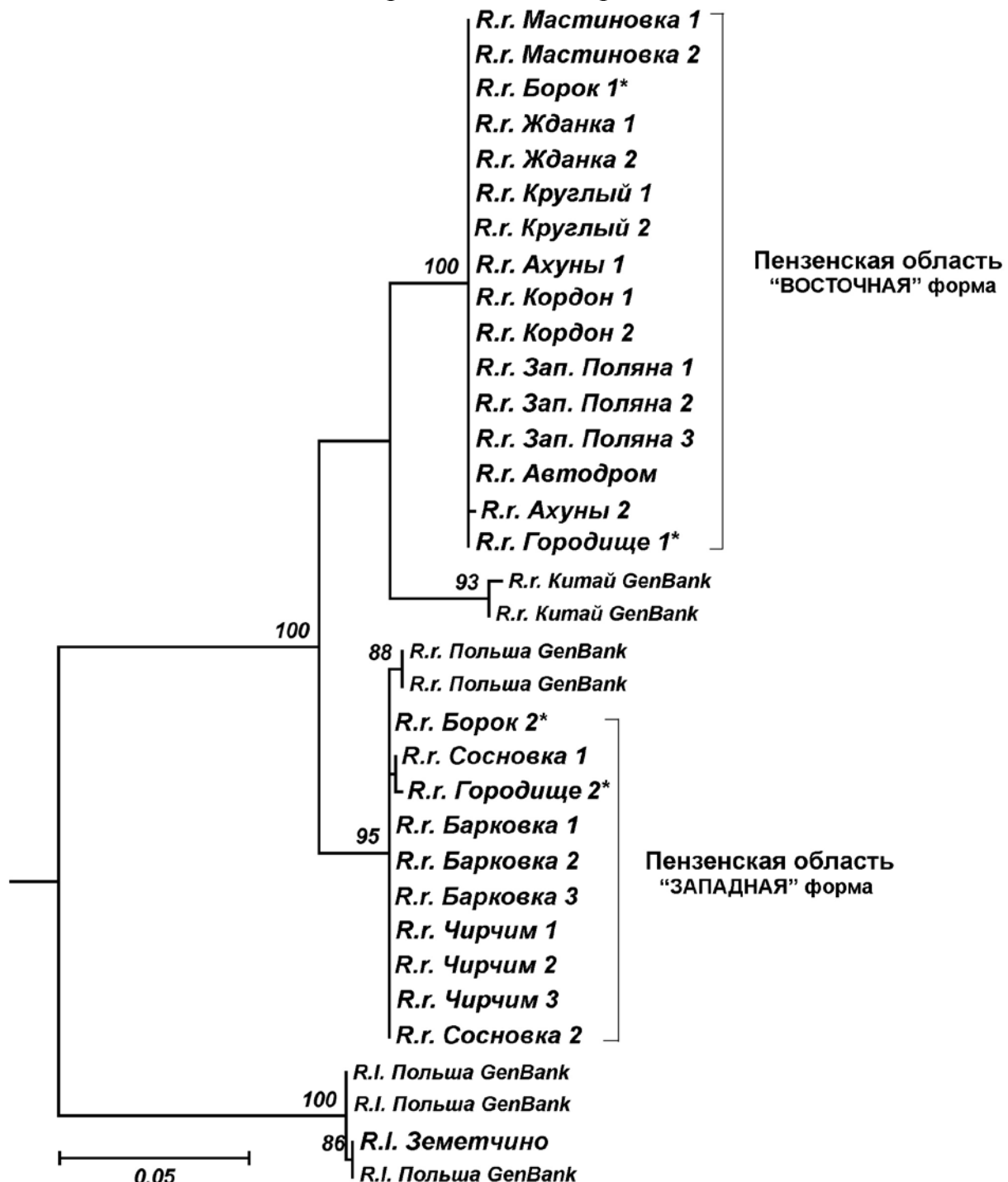


Рис. 8. ML – дерево озерных (*R.r.*) и прудовых (*R.l.*) лягушек по данным секвенирования COI. Обозначения 1, 2, 3 относятся к разным особям из одной выборки, *GenBank* – последовательности из базы данных NCBI. Звездочкой обозначены места совместного обитания (синтопии) «западной» и «восточной» форм. Индексы бутстреп-поддержки <70 % и внешняя группа не показаны

Из них к «западной» форме отнесены популяции лягушек Пензенской обл., гаплотипы которых минимально отличались от гаплотипов Польских лягушек (база данных NCBI), образуя с ними единую кладу с 95% поддержкой. Гаплотипы остальных популяций области отнесены нами к «восточной» форме, которая оказалась сестринской к экземплярам из Китая. Генетическая дифференциация двух форм озерной лягушки в пределах нашей области явно превышает таковую между популяциями прудовой лягушки (*R.l.*), обитающими в Пензенской области и в Восточной Европе (рис. 8). Интересно, что нами выявлено два случая синтопии (совместного обитания) двух форм озерной лягушки, что предполагает возможность существования между ними гибридизации. Пространственно и биотопически «западная» форма отмечена в слабо трансформированных местообитаниях зоны смешанных и широколиственных лесов Сурского природно-территориального участка. «Восточная» форма, по-видимому, экологически более пластична, заселяет водоемы урбанизированных и селитебных ландшафтов, а также встречается в биотопах открытых пространств.

Таким образом, применение комплексного анализа позволило выявить новый для фауны Пензенской области вид – съедобную лягушку, обнаружить в Поволжье зону контакта ареалов двух криптических форм озерной лягушки – «западной» и «восточной», и найти морфологические и биоакустические различия между ними. Это имеет важное значение как при рассмотрении теоретических вопросов биологии, например, микроэволюционных процессов, так и для решения практических задач изучения и сохранения биоразнообразия.

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК В УСЛОВИЯХ ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Изучение влияния антропогенного фактора на диких животных, включая амфибий, представляет не только общебиологический, но и прикладной интерес. Земноводные активно используются в качестве биоиндикаторов состояния антропогенно нарушенных экосистем в связи с высоким уровнем гетерогенности их популяций под влиянием стрессовых факторов – вплоть до проявления аномалий и изменения генетических характеристик.

5.1. Морфологические аномалии зеленых лягушек. В Поволжье и на сопредельных территориях исследования, посвященные морфологическим аномалиям бесхвостых амфибий, проводились в Республике Татарстан (Замалетдинов, 2003), Самарской (Файзулин, 2005) и Тамбовской областях (Lada, 1999). Однако подобная информация по Пензенской области до настоящего времени отсутствовала.

У просмотренных экземпляров озерных лягушек зарегистрированы следующие случаи морфологических аномалий.

Эктромелия – уменьшение числа фаланг пальцев. У одного из 15 экз. (ручей Круглый, Пензенское вдхр.) отсутствовали дистальные фаланги третьего и четвертого пальцев левой задней конечности, и у одного из 15 экз. (дачный поселок «Сосновка», старица р. Суры) отсутствовала дистальная фаланга четвертого пальца передней конечности. **Микродактилия** – уменьшение длины паль-

ца. Отмечена у одного из 16 экз. (Солдатское озеро, г. Пенза) – укорочен четвертый палец правой передней конечности. **Циклопия** – врождённое отсутствие одного глаза. Аномалия встречена у одного экз. (Солдатское озеро). **Полидактилия** – многопалость, наличие лишних, дополнительных пальцев, а также раздвоение фаланг или метатарзалий. В точке «Сосновка» у двух из 12 особей обнаружена полидактилия задних конечностей. Кроме того, одна из этих особей имела дополнительные пальцы и на передних конечностях. На задних конечностях у обеих лягушек наблюдалось удвоение метатарзалий I пальца, дополнительный палец между I и II пальцами (рис. 9а) и отсутствие пяточных бугров. На передних конечностях у одной из этих особей наблюдалось раздвоение проксимальных фаланг I пальца (рис. 9б). Случай интересен тем, что полидактилия в нашем случае имеет симметричный характер, тогда как обычно подобные аномалии либо односторонние, либо двусторонние, но не симметричные (Sas, Kovacs, 2006) (рис. 9).

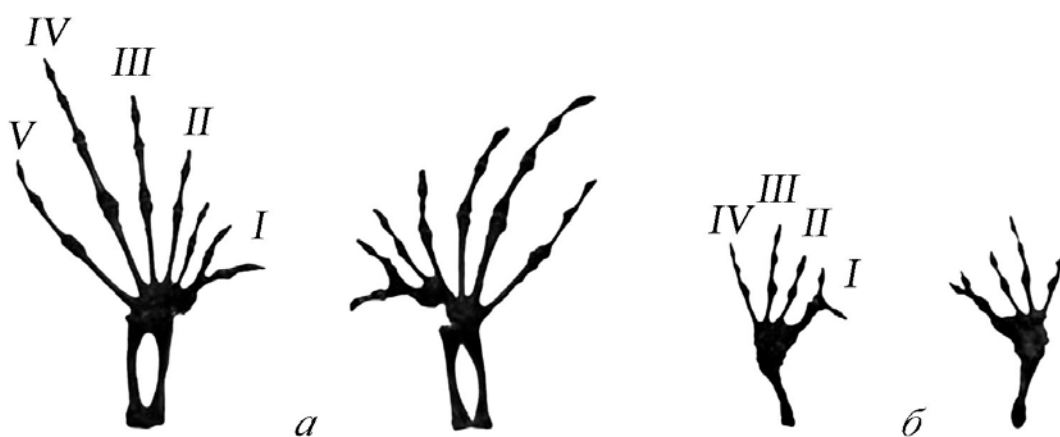


Рис. 9. Скелет задних (а) и передних (б) конечностей самца *Rana ridibunda* с симметричной полидактилией (точка «Сосновка»). Римскими цифрами обозначены номера пальцев на левых конечностях

У прудовых лягушек (г. Пенза, п. Согласие) встречен только один тип аномалий – асимметричная полидактилия задних конечностей (гексадактилия на правой, и гептадактилия на левой).

Из четырех точек, в которых были найдены особи с морфологическими аномалиями, две – «Сосновка» и «Солдатское озеро» – несут повышенную рекреационную нагрузку, одна – «Согласие» – сильно загрязнена бытовыми отходами, и одна – «ручей Круглый» – находится недалеко от мест прежнего уничтожения химического оружия открытым способом (Иванов, Панкратов, 2006). Возможно, находки в этих точках лягушек с аномалиями развития связаны именно с этими факторами.

Частота встречаемости аномалий у *R. lessonae* составила 9,5 %, у *R. ridibunda* в отдельных точках – 6,7 %, 12,5 % и 16,7 %. В целом по выборке зеленых лягушек ($n=93$), отловленных в водоемах г. Пензы и окрестностей, частота аномалий составила 8,6 %. Отметим, что особи с мальформациями не отмечены в водоемах с низкой антропогенной нагрузкой.

5.2. Генетическая изменчивость озерных лягушек в биотопах с разной антропогенной нагрузкой. Генетический полиморфизм озерных лягушек изучен с помощью RAPD-метода в трех биотопах с разной степенью трансформации ландшафтов: фоновый биотоп с минимальным антропогенным влиянием – участок «Борок» заповедника «Приволжская лесосотепь», р. Кадада (точка «Контроль»), и два биотопа, находящиеся под антропогенным влиянием. Первый – старица р. Суры в зоне защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия (точка «ОУХО»), и второй – пруд в парковой зоне г. Пензы в микрорайоне Западная Поляна (точка «Город»). Анализ генетического полиморфизма популяций, вычисленный по формуле: $P=x/m$, где x – число полиморфных локусов, m – общее число проанализированных локусов, показал, что его уровень в целом по выборке изменяется в пределах значений от 0,38 до 0,88. При межпопуляционном сравнении средних значений выявлено, что наиболее богатым спектром ПЦР-фрагментов, и, соответственно, высоким генетическим полиморфизмом (0,75) отличается выборка лягушек из наименее трансформированного биотопа «Контроль» (рис. 10).

У лягушек, обитающих в антропогенно трансформированных биотопах, уровень полиморфизма снижается, причем его наименьшее значение (0,55) обнаружено у лягушек из селитебной зоны – точка «Город». Выборка из зоны защитных мероприятий объекта по уничтожению химического оружия – точка «ОУХО» – имеет промежуточное значение. Достоверные отличия ($p<0,05$) уровня генетического полиморфизма обнаружены только при сравнении выборки «Контроль» и «Город». Таким образом, генетическая изменчивость популяций озерных лягушек исследованных биотопов имеет обратную зависимость от степени антропогенной нагрузки.

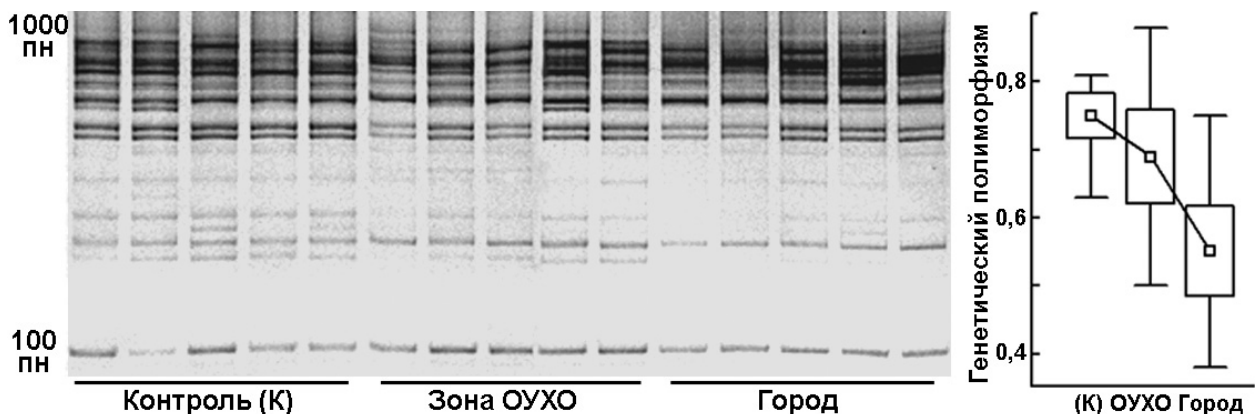


Рис. 10. Элетрофореграмма фрагментов амплификации с RAPD-праймером ОРА-01 (слева) и уровень генетического полиморфизма (справа) экземпляров озерной лягушки из трех исследованных биотопов с разной антропогенной нагрузкой

ГЛАВА 6. СОСТОЯНИЕ ОХРАНЫ ЗЕМНОВОДНЫХ В ПЕНЗЕНСКОЙ ОБЛАСТИ И РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СОХРАНЕНИЮ ИХ РАЗНООБРАЗИЯ

В настоящее время из 11 видов земноводных, обитающих в Пензенской области, два включены в Красную книгу (2005) – прудовая лягушка и травяная лягушка (*R. temporaria*). Этим видам присвоена категория 4 – неопределенный по статусу вид. Кроме того, в приложение к Красной книге занесены обыкно-

венный тритон (*Lissotriton vulgaris*) и обыкновенная, или серая жаба (*Bufo bufo*), как виды, нуждающиеся в особом внимании к их состоянию в окружающей среде. На территории участков заповедника «Приволжская лесостепь» отмечены десять видов амфибий (Павлов, 1999), т.е. все земноводные области, за исключением съедобной лягушки. Другие меры охраны земноводных в регионе не применяются.

В ходе исследований мы оценивали редкость видов по показателю встречаемости (Стрелков, Ильин, 1990), выраженному в процентах отношении мест находок каждого вида к общему количеству мест обнаружения земноводных. Таким образом, были выделены 3 категории: «редкие» (0–7 %), «обычные» (8–14 %) и «часто встречающиеся» (>15 %) виды (рис. 11).

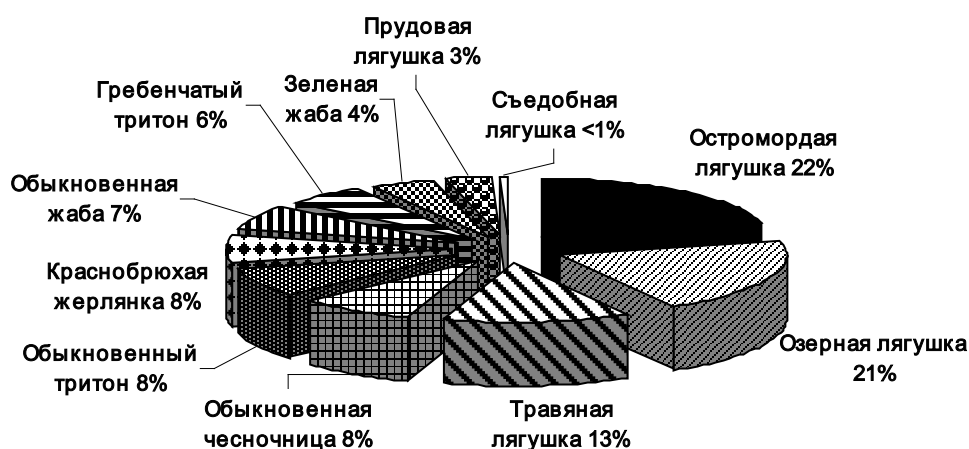


Рис. 11. Диаграмма встречаемости видов амфибий на территории Пензенской области

Для сохранения разнообразия амфибий в регионе представляется целесообразным:

- создание зоологического заказника в Земетчинском районе Пензенской области, где отмечены редкие виды не только батрахофауны, но и других классов позвоночных животных, занесенных в Красную книгу области;

- проведение просветительской работы с населением, направленной на изменение негативного отношения к этой группе животных. Положительный эффект подобной работы имел место в 2001 г. при осуществлении в ряде областей Поволжского региона, в том числе Пензенской, образовательного проекта «Царевна-лягушка» (Материалы..., 2002);

- рекомендовать для включения в Красную книгу Пензенской области съедобную лягушку с категорией 4 – неопределенный по статусу вид.

ВЫВОДЫ

1. Современная фауна амфибий Пензенской области представлена 11 видами, неравномерно распределенными по трем природно-

территориальным участкам, что связано как с разнородностью биотопов, так и со степенью их изученности.

2. Результаты анализа межпопуляционной изменчивости морфологических, биоакустических и молекулярно-генетических признаков позволили обнаружить обитание на территории области гибридного вида – съедобной лягушки (*Rana esculenta*), а также криптических форм озерной лягушки («западной» и «восточной»).

3. Случаи морфологических аномалий (эктромелия, микродактилия, циклопия, полидактилия) отмечены у зеленых лягушек только в черте г. Пензы с частотой аномалий 8,6 %.

4. Анализ генетического полиморфизма популяций озерной лягушки выявил, что с повышением степени антропогенной трансформации биотопов генетическое разнообразие снижается, не достигая, однако, уровня мономорфности.

5. Анализ кадастровой информации позволяет отнести к редким видам региона (встречаемость 0–7 %) гребенчатого тритона, обыкновенную жабу, зеленую жабу, прудовую лягушку, съедобную лягушку; к обычным видам (8–14 %) – обыкновенного тритона, краснобрюхую жерлянку, обыкновенную чесночницу, травяную лягушку; к многочисленным видам (>15 %) – озерную и остромордую лягушек. Предложен комплекс мер, направленных на сохранение разнообразия земноводных, включающий создание особо охраняемых природных территорий, расширение списка охраняемых видов и проведение просветительской работы с населением.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых журналах из перечня ВАК

1. Закс М.М., Симонов Е.П., Ермаков О.А. Распространение земноводных (Amphibia) на территории Пензенской области // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2011. № 25. С. 181–190.
2. Закс М.М. К вопросу о морфологических различиях популяций озерной лягушки (*Pelophylax (Rana) ridibundus*) Пензенской области // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 209–212.
3. Закс М.М., Ермаков О.А. Межпопуляционная изменчивость звукового сигнала озерной лягушки *Pelophylax (Rana) ridibundus* в Среднем Поволжье // Известия ПГПУ им. В.Г. Белинского. 2012. № 29. С. 213–215.

Статьи в журналах и сборниках

4. Закс М.М. Биоакустический анализ звуковых сигналов зеленых лягушек *Rana kl. esculenta*-комплекс (предварительные данные) // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2008. № 10. С. 178–181.
5. Закс М.М. О морфологических аномалиях зеленых лягушек (*Rana ridibunda*, *R. lessonae*) г. Пензы // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. 2008. № 14. С. 63–65.
6. Закс М.М. Морфометрия и аномалии развития зеленых лягушек *Rana esculenta*-комплекс Пензенской области // Экологический сборник –

2. Труды молодых ученых Поволжья. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2009. С. 51–55.
7. Закс М.М., Рыжов М.К., Ермаков О.А. Съедобная лягушка (*Rana esculenta*, L., 1758) в Чувашии: биоакустические данные // Вопросы герпетологии: Матер. IV съезда герпетологического об-ва им. А.М. Никольского. СПб: Русская коллекция, 2011. С. 93–96.
8. Закс М.М. Материалы к кадастру земноводных (Amphibia) Пензенской области // Региональные кадастры животного и растительного мира и Красные книги: Матер. Всеросс. науч.-практ. конф. (24–25 сентября 2012 г., Тамбов – Галдым). Тамбов: ТГУ, 2012. С. 28–33.

Тезисы конференций и совещаний

9. Закс М.М. История и перспективы изучения герпетофауны Пензенской области // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Матер. Междунар. науч. конф., посв. 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина (13–16 мая 2008 г., Пенза). Часть 2. Пенза: ПГПУ им. В.Г. Белинского, 2008. С. 246–247.
10. Закс М.М. Полидактилия у озерной лягушки *Rana ridibunda* как показатель состояния водных биотопов // Биология – наука XXI века: Сб. тезисов 14-й Междунар. Пущинской школы-конф. молодых ученых. Т. 2. Пущино, 2010. С. 36.

Благодарности. Автор выражает благодарность О.А. Ермакову за руководство работой на всех этапах ее осуществления, коллективу кафедры зоологии и экологии Пензенского государственного университета за плодотворное общение, РФФИ за финансовую помощь в проведении исследований (проект № 12-04-97073-р_поволжье_a).