



Уральский  
федеральный  
университет

имени первого Президента  
России Б.Н.Ельцина

Институт  
естественных наук

**В. Л. ВЕРШИНИН**

# ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНОМАЛИЙ И ПАТОЛОГИЙ АМФИБИЙ

Учебное пособие



Министерство образования и науки Российской Федерации

Уральский федеральный университет  
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина

В. Л. ВЕРШИНИН

ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ  
И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ  
АНОМАЛИЙ И ПАТОЛОГИЙ  
АМФИБИЙ

Рекомендовано в качестве учебного пособия для студентов,  
обучающихся по программам бакалавриата и магистратуры  
по направлениям подготовки 060301 «Биология»,  
060401 «Биология», 050306 «Экология»,  
050406 «Экология».

Екатеринбург  
Издательство Уральского университета  
2015

УДК 597.6:591.4.068.1  
В 37

Рецензенты:

Филинкова Т. Н., кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, экологии и методики их преподавания УрГПУ;

Жигальский О. А., доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией ИЭРиЖ УрО РАН.

**Вершинин, В. Л.**

В 37 Основы методологии и методы исследования аномалий и патологий амфибий : [учеб пособие] / В. Л. Вершинин. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2015. – 80 с.

ISBN 978-5-7996-1420-1

Учебное пособие составлено на основе литературных и авторских материалов 37-летней практики мониторинга аномалий земноводных. Цель издания – координация исследований для получения сравнимых результатов на основе единых методик. Обозначены методологические подходы, приведены классификации аномалий, примеры структуры баз данных, методы сбора, обработки, качественного и количественного анализа.

Книга адресована зоологам и экологам, специалистам, работающим в области морфогенеза, экологического мониторинга, преподавателям, студентам-биологам.

УДК 597.6:591.4.068.1

ISBN 978-5-7996-1420-1

© Вершинин В. Л., 2015

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ. ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ</b> .....	5
<b>Глава 1. ПРОФИЛИРОВАНИЕ МОРФООБЛИКА И СТРУКТУР ОРГАНИЗМА</b> .....	10
<b>Глава 2. ПЛАНИРОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И СБОР ПЕРВИЧНОГО МАТЕРИАЛА</b> .....	15
Рандомизация .....	15
Репрезентативность выборок .....	16
Выборочные методы .....	17
Использование таблиц случайных чисел .....	21
Независимость .....	23
Объем выборки .....	24
Оценка ошибок .....	26
Соглашение о пяти процентах .....	27
Мощность, величина эффекта и объем выборки .....	28
Статистическая значимость и реальная достоверность .....	33
<b>Глава 3. СТРУКТУРЫ БАЗ ДАННЫХ</b> .....	37
<b>Глава 4. КЛАССИФИКАЦИИ АНОМАЛИЙ</b> .....	40
Принципы классификации аномалий .....	40
Аномалии икры и кладок амфибий .....	45
Патологии развития эмбрионов остромордой лягушки, <i>Rana arvalis</i> .....	46
Аномалии личинок амфибий .....	49
Классификация внешних морфологических аномалий бесхвостых амфибий .....	52
Классификация девиантных форм скелета бесхвостых амфибий .....	54

Варианты внешних морфологических аномалий хвостатых амфибий .....	58
Классификация инфекций и инвазий амфибий .....	61
Патологии печени и других органов .....	61
<b>Глава 5. МЕТОДИКИ ПРОСВЕТЛЕНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ</b> .....	63
Метод Даусона .....	63
Приготовление и применение бинарного красителя .....	64
Методика изготовления и применения бинарного красителя .....	65
Протокол по просветлению и окраске хрящевых и костных структур для исследования .....	66
<b>Глава 6. СХЕМА РАСЧЕТНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕННЫХ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ</b> .....	68
Простые показатели .....	68
Расчетные показатели .....	69
Интерпретация результатов .....	70
<b>Глава 7. БИОИНДИКАЦИОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНОМАЛИЙ</b> .....	72
Биоиндикационные параметры .....	74

## **ВВЕДЕНИЕ. ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ**

От того, что мы будем знать, зависит то, чем мы станем...

*Жан Ростан*

Любой признак обладает генетической основой, определяющей пределы реализации его формообразовательной потенции. Дефинитивный облик складывается в ходе онтогенеза в результате интеграции носителя генотипа в конкретные условия среды.

По современным представлениям [Инге-Вечтомов, 2010], изменчивость формируется на основе сложного взаимодействия реплицируемого генотипа и экспрессии регуляторов морфогенеза, в котором условия среды играют роль медиатора.

Формирование в ходе онтогенеза любых фенотипических признаков как структурных (например, пятипалая конечность), так и окрасочных (характерный для вида рисунок) происходит при внутригеномных взаимодействиях систем генов-регуляторов [Kondo, Mura, 2010; Нох Genes, 2012] по принципу реакционно-диффузионной модели А. Тьюинга [Turing, 1952]. От уровня экспрессии генов-интеграторов морфогенеза в конкретных условиях среды зависит дефинитивный облик особи.

Исследования, ограниченные рамками морфологической «нормы» (в пределах модальных классов кривой нормального распределения), связаны главным образом с изучением внутривидового разнообразия, определяющегося гомеостатированием популяций вида в условиях разнообразной в пределах ареала среды [Вавилов, 1967]. Эти сведения связаны не столько с незавершенностью процессов эволюции, сколько с различной адаптированностью популяций, слагающих вид. Поэтому такой подход закрывает возможность к получению информации именно об эволюционных преобразованиях (трендах), так как крайние, наиболее уклоняющиеся (варианты по Ч. Дарвину) значения являются членами того же множества [Вершинин, 2009].

Эволюционный процесс, проявляющийся в постоянной трансформации генетических систем, в определенном смысле «не различает» видов как таковых (что созвучно номиналистским пред-

ставлениям Ж.-Б. Ламарка о виде как о формальной категории, существующей только в человеческом сознании) и направлен на их разрушение (дестабилизацию) или преобразование [Ламарк, 1935].

Известно, что девиантные или аномальные формы одних видов встречаются у близких видов того же таксона в качестве нормы [Evolution, 1988]. У генетически близких форм – видов одного рода могут быть гомологичные гены и проявляющие одинаковую изменчивость [Вавилов, 1967]. В соответствии с законом гомологических рядов, в близких таксонах многие признаки проявляются параллельно. Исследование гомологических рядов показывает, что они наиболее отчетливо прослеживаются на уровне родов [Розанов, 1973]. Гомологические ряды – отражение блочного модульного принципа структуры биологических систем, подразумевающего, что эволюционные преобразования одноименных структур связаны с перераспределением функциональных блоков близких или идентичных у различных организмов [Уголев, 1990].

Как эволюционные инновации, так и морфозы (аномалии) далеко выходят за пределы модальной части распределения. Кроме того, что закономерности формирования морфозов и эволюционных преобразований обладают «единой логикой», так как и те и другие базируются на одной материальной основе, определенным образом их канализирующей, поскольку, в соответствии с принципом блочности, «все ныне существующее возникло за счет комбинаторики исходно возникшего небольшого числа неких инвариантных доменов, которые далее комбинировались в разных сочетаниях» [Инге-Вечтомов, 2004]. Эволюция действует путем «перелицовки старого» [Jacob, 1977], так как ее возможности лежат в пределах биохимических особенностей вида (варианты, для формирования которых нет никакой наследственной основы для возникновения, не появятся) [Тимофеев-Ресовский и др., 1973].

Одним из важнейших следствий основ и механизмов морфогенеза является единство закономерностей на молекулярном и морфологическом уровнях, подчиняющихся принципу блочности биологических структур и их преобразования (тандемные дубликации, полимеризация, дивергенция, олигомеризация, редукция, новообразование) [Догель, 1954; Северцов, 1939; Ohno, 1970; Britten, Davidson, 1971].

Как феномен тераты с давних времен привлекали внимание человечества, что имеет множество документальных подтверждений [Леруа, 2011]. Однако сами по себе важные коллекционные материалы (своеобразные «кунсткамеры») еще не обеспечивают понимания. Необходим перевод накопленной информации об аномалиях в область рационального знания. Путь этот в первую очередь лежит в направлении понимания их эволюционного значения, молекулярных механизмов морфогенеза вкупе с экологической и регуляторной составляющими, на основе знаний о которых становится возможным переход к оценке здоровья среды (биоиндикации).

Первый шаг в нужном направлении был сделан в XVIII в. В. Гете [Goethe, 1790] на растениях, а позднее Жоффруа Сент-Илером [Saint-Hilaire, 1822] в XIX в. на животных и человеке. Изучение аномалий в строении растений способствовало появлению книги В. Гете «Метаморфоз растений» [Goethe, 1790] с изложением гипотезы о происхождении органов высших растений. Ж. Сент-Илер [Saint-Hilaire, 1822] использовал сведения по тератологии для подкрепления своих трансформистских взглядов. Нельзя не вспомнить, что именно пелории льнянки навели К. Линнея (в 1776 г.) на мысль о возможности появления новых видов.

Для каждого вида характерно наличие специфического спектра и частот морфологических аномалий, это «функция способа морфогенеза» пока данный вид существует [Коваленко, 2003].

Соотношение потенциального и реализованного спектров аномалий определенным образом характеризует среду, в которой существует популяция. Можно сказать, что условия, в которых экспрессируют *Нох*-гены (регуляторы и координаторы морфогенеза), «профилируют» морфооблик популяции, в том числе и спектр аномалий.

### Библиографические ссылки

*Вавилов Н. И.* Закон гомологичных рядов в наследственной изменчивости: Линнеевский вид как система. Л.: Наука, 1967. С. 1–92.

*Вершинин В. Л.* Девиантные формы морфологической изменчивости амфибий как метод исследования микроэволюционных процессов // Эко-



логия в высшей школе: синтез науки и образования : материалы Всерос. науч.-практ. конф. 30 марта – 1 апреля 2009 г. Ч. 1. Челябинск: Изд-во Челяб. гос. пед. ун-та, 2009. С. 13–19.

*Догель В. А.* Олигомеризация гомологичных органов как один из главных путей эволюции животных. Л.: Изд. ЛГУ, 1954. С. 338.

*Инге-Вечтомов С. Г.* Блочный принцип в теории эволюции. Перспективы и парадоксы // *Фундаментальные зоологические исследования. Теория и методы.* М. – СПб.: Т-во научных изданий КМК, 2004. С. 74–87.

*Инге-Вечтомов С. Г.* Изменчивость, матричный принцип и теория эволюции // *Чарльз Дарвин и современная биология : труды Международ. науч. конф. «Чарльз Дарвин и современная биология» (21–23 сентября 2009 г., Санкт-Петербург).* СПб.: Нестор-История, 2010. С. 49–60.

*Коваленко Е. Е.* Эффект нормы признака и его теоретическое значение // *Эволюционная биология: история и теория.* СПб., 2003. Вып. 2. С. 66–87.

*Ламарк Ж.-Б.* *Философия зоологии.* Т. 1. Л.–М.: Биомедгиз, 1935. 330 с.

*Леруа А. М.* *Мутанты.* М.: Астрель: CORPUS, 2011. 560 с.

*Розанов А. Ю.* Закономерности морфологической эволюции археоциат и вопросы ярусного расчленения нижнего кембрия. М.: Наука, 1973. 164 с.

*Северцов А. Н.* *Морфологические закономерности эволюции.* М. Л.: Изд-во АН СССР, 1939. 610 с.

*Тимофеев-Ресовский Н. В., Яблоков А. В., Глотов Н. В.* *Очерк учения о популяции.* М.: Наука, 1973. 278 с.

*Уголев А. М.* Концепция универсальных функциональных блоков и дальнейшее развитие учений о биосфере, экосистемах и биологических адаптациях // *Эволюция биохимии и физиологии.* 1990. Т. 26, № 4. С. 441–454.

*Britten R., Davidson E.* Repetitive and Non-repetitive DNA Sequences and a Speculation on the Origin of Evolutionary Novelty // *Quart. Rev. Biol.* 1971. V. 46. P. 111–138.

Evolution and morphogenetic rules: the shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny / G. F. Oster, N. Shubin, J. D. Murray, P. Alberch // *Evolution.* 1988. V. 42, № 5. P. 862–884.

*Goethe J. W.* Versuch die Metamorphose der Pflanzen zu erklären. Gotha: C. W. Ettinger, 1790. 86 S.

Hox Genes Regulate Digit Patterning by Controlling the Wavelength of a Turing-Type Mechanism / R. Sheth, L. Marcon, M. F. Bastida, M. Junco, L. Quintana, R. Dahn, M. Kmita, J. Sharpe, M. A. Ros // *Science.* 2012. V. 338. P. 1476–1980.

- Jacob F.* Evolution and tinkering // *Science*. 1977. V. 196. P. 1161–1166.
- Kondo S., Miura T.* Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation // *Science*. 2010. V. 329. P. 1616–1620.
- Ohno S.* Evolution by gene duplication. Springer-Verlag. New York, 1970. 160 p.
- Saint-Hilaire G.* Philosophie anatomique. II. Paris, 1822. 372 p.
- Turing A. M.* The Chemical Basis of Morphogenesis // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* (Aug. 14, 1952). V. 237, № 641. P. 37–72.

## ПРОФИЛИРОВАНИЕ МОРФООБЛИКА И СТРУКТУР ОРГАНИЗМА

Появление интеграторов морфогенеза (*Hox*-генов и др.) около 700–800 млн лет назад было крупнейшим ароморфозом, повлекшим за собой взрыв формообразования [Ferrier, Holland, 2001; Erwin, Davidson, 2002; Peterson, Eernisse, 2001].

Фактически *Hox*-гены – центральные регуляторы многих генных сетей морфогенеза, чью работу контролируют также компоненты сигнальных каскадов и тканеспецифичные транскрипционные факторы [Nombria, Lovegrove, 2003; Колчанов, Суслов].

Сейчас известно, что многие особенности внешнего облика каждого из отделов тела особей определяются гомеотическими генами, контролирующими развитие осевых структур, сегментацию, закладку конечностей и пр. [Малахов, 2004а; Малахов, 2004б], а точнее продуктами их экспрессии, уровнем, временем, длительностью, местом действия и их взаимодействием [Turing, 1952].

Мутации таких генов приводят к изменениям идентичности органов, гетеротопии [Баттулин, 2014]. Сходные эффекты могут быть связаны не только с изменением ключевой последовательности, но и с регуляцией работы генов (эпигенетическими механизмами), когда обычный ген экспрессирует в необычном месте или в необычное время.

Гетерохронии как отклонения онтогенеза меньше влияющие на выживаемость особей, не вызывая резких нарушений канализации отдельных процессов, могут привести в конечном итоге к значительным изменениям морфологии [Alberch, 1981]. Амплификация мелких изменений в ходе развития может существенно влиять на дефинитивный облик.

Спектр профилируемых вариантов морфологии из области модальной части распределения признака определяет адаптивный потенциал («ресурс») популяции в пределах существующей нормы реакции и представляет собой главным образом то, что ортодоксы СТЭ определяют как модификационную изменчивость.

Напротив, спектр профилируемых морфологических вариантов из краевой области нормального распределения, относимых к «фенодевиантам» [Алтухов, 2003], позволяет оценить эволюционный резерв формообразовательной потенции популяции или вида.

По сходству аминокислотных последовательностей четыре кластера паралогичных *Hox*-генов позвоночных (сформировавшихся благодаря двум полногеномным дупликациям) делят на 3 ортологичные группы – anteriornую, центральную и постериорную [Changes in Hox, 2010]. Все 5 генов anteriornой группы высококонсервативны [Баттулин, 2014; Колчанов, Суслов]. Области экспрессии *Hox*-генов располагаются вдоль тела животного в том же порядке, что и гены в хромосоме (принцип коллинеарности). Порядок экспрессии схож у беспозвоночных и позвоночных, несмотря на их давнюю дивергенцию.

Нормальный морфогенез всех структур жестко определяется соблюдением целого комплекса условий, профилирующих определенный морфооблик. Так, отсутствие ребер на 7-м шейном позвонке человека требует, чтобы присутствовали гены: *HoxA4*, *HoxA5*, *HoxB5*, *HoxA6*, *HoxB6*, а все остальные постериорно расположенные *Hox*-гены отсутствуют [Леруа, 2010].

Одна из функций *Hox*-генов позвоночных – дифференциация метамерного осевого скелета (позвонков), которая регулируется экспрессией *Hox4*, *Hox5*, *Hoxa*, *Hox9*, *Hox10*, *Hox11* – генов [Pearson et al., 2005; Wellik, 2009].

Поскольку развитие каждого из метамеров позвоночных контролируется двумя-четырьмя паралогами, компенсирующими недостатки в экспрессии друг друга отклонения в этих отделах, сравнительно редки.

Особенности регуляторики зоны экспрессии гена *HoxC8*, контролирующего формирование грудной клетки, определяют специфику строения и положения этого отдела в разных систематических группах [Бородин, 2009].

Различие зон экспрессии гена *HoxC6* определяет различия в позвоночнике и в грудном отделе [Баттулин, 2014].

У большинства позвоночных зачатки передних конечностей формируются у передней границы области экспрессии гена *HoxC6*. Совместная экспрессия *HoxC6* и *HoxC8* приводит к фор-

мированию позвонков *грудного* отдела, несущих ребра. Так как *HoxC8* подавляет развитие зачатка конечностей, то конечность может сформироваться только в отделе, экспрессирующем *HoxC6* и не экспрессирующем *HoxC8*.

Разметка зоны поляризующей активности осуществляется благодаря экспрессии гена *Shh* (нарушения работы зоны поляризующей активности приводят к тяжелым уродствам кистей и стоп), зачатки скелета маркирует экспрессия гена *Sox9* [Digit loss..., 2013].

Формирование пятипалых конечностей и их поясов у наземных тетрапод связано с экспрессией генов *HoxD* с 9 по 13.

Существует две отдельных фазы (волны) экспрессии генов *HoxD* в ходе формирования конечностей тетрапод. Первая способствует формообразованию в проксимальных отделах конечности, тогда как вторая – наиболее дистантной части конечности (пальцы) [Tanaka, 2009].

В зависимости от различных сочетаний отключения генов-регуляторов – *HoxA13*, *HoxD11–13* и *Gli3* (transcription factor *Gli1* etc.) – возможно формирование в ходе морфогенеза всех вариантов: от пятипалой конечности до многолучевого «плавника» [Hox Genes..., 2012].

Эволюционные изменения длительности экспрессии *HoxD12–13* приводят к полифалангии. *HoxD*-гены ответственны за число пальцев, образование перепонки и высокую изменчивость отделов конечности [Cohn, Bright, 1999]. Нарушение экспрессии гена *Tbx5* может приводить к полному отсутствию передних конечностей у новорожденных [Cohn, Bright, 1999].

Развитие глаз позвоночных определяется районами и уровнем экспрессии генов *Pax2* и *Pax6*, которые регулируются белком *Shh* [Gilbert, 2010]. Изменения регионов экспрессии этих генов у пещерной рыбы *Astyanax mexicanus* привело к отсутствию нормально сформированных глаз.

В соответствии с современными представлениями о процессах морфогенеза изучение морфологических аномалий, кроме их инвентаризации, подразумевает отказ от простого описательного феноменологического подхода в пользу анализа и синтеза. После того как стало очевидно, какую ценную информацию может принести исследование аномалий, необходимо определить что и как делать.

В первую очередь необходима систематизация всех наблюдаемых аномалий. Первичная инвентаризация исследуемого множества девиантных форм должна основываться на определенной классификации. Логично, чтобы порядок расположения вариантов аномальных структур в классификациях соответствовал естественному порядку, в котором происходит дифференцировка основных частей тела двусторонне симметричных (билатеральных) животных. Как правило, у раннего эмбриона сначала начинают работать регуляторные *Hox*-гены, отвечающие за строение органов головной, затем грудной и позже хвостовой части [Lemons, McGinnis, 2006].

В разделах, приведенных ниже, излагаются подходы, общие принципы и выработанные версии унифицированных классификаций морфологических аномалий амфибий, методы сбора, первичной, камеральной и статистической обработки материала. Обсуждаются параметры, которые могут служить основой для оценки здоровья среды (биоиндикации), а также структура баз данных по профильной литературе и фактическому материалу.

### Библиографические ссылки

*Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях / отв. ред. Л. А. Животовский. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431 с.

*Баттулин Н. Р.* Генетика развития // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18, № 1. С. 103–111.

*Бородин П. М.* Перечитывая «Происхождение видов» // Природа. 2009. № 3. С. 20–21.

*Колчанов Н. А., Суслов В. В.* Кодирование и эволюция сложности биологической организации. URL: <http://www.bionet.nsc.ru/live/altay/live.php?f=doclad&p=kolchanov>.

*Леруа А. М.* Мутанты. О генетической изменчивости и человеческом теле. М.: Астрель, Corpus, 2010. 560 с.

*Малахов В. В.* Новый взгляд на происхождение билатералий // Природа. 2004а. Т. 1, № 1. С. 93–103.

*Малахов В. В.* Происхождение билатерально-симметричных животных (Bilateria) // Журнал общей биологии. 2004б. Т. 65, № 5. С. 371–388.

*Alberch P.* Convergence and parallelism in foot morphology in the Neotropical salamander genus *Bolitoglossa*. 1. Function // Evolution. 1981. V. 35, № 1. P. 84–100.

Digit loss in archosaur evolution and the interplay between selection and constraints / M. A. G. de Bakker, D. A. Fowler, K. den Oude, E. M. Dondorp, M. C. J. Navas, J. O. Horbanczuk, J.-Y. Sire, D. Szczerbinska, M. K. Richardson // *Nature*. 2013. V. 500. P. 445–448.

*Cohn M. J., Bright P. E.* Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations // *Cell Tissue Res*. 1999. V. 296. P. 3–17.

Changes in Hox genes' structure and function during the evolution of the squamate body plan / N. Di-Poi, J. I. Montoya-Burgos, H. Miller, O. Pourquie, M. C. Milinkovitch, D. Duboule // *Nature*. 2010. V. 464. P. 99–103.

*Erwin D. H., Davidson E. H.* The last common bilaterian ancestor // *Development*. 2002. V. 129. P. 3021–3032.

*Ferrier D. E., Holland P. W.* Ancient origin of the Hox gene cluster // *Nat. Rev. Genet*. 2001. V. 2. P. 33–38.

*Gilbert S. F.* *Developmental biology*. 9-th edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 2010. 808 p.

*Hombria J. C., Lovegrove B.* Beyond homeosis – HOX function in morphogenesis and organogenesis // *Differentiation*. 2003. V. 71. P. 461–476.

Hox Genes Regulate Digit Patterning by Controlling the Wavelength of a Turing-Type Mechanism / R. Sheth, L. Marcon, M. F. Bastida, M. Junco, L. Quintana, R. Dahn, M. Kmita, J. Sharpe, M. A. Ros // *Science*. 2012. V. 338. P. 1476–1980.

*Lemons D., McGinnis W.* Genomic Evolution of Hox Gene Clusters // *Science*. 2006. V. 313, № 5795 P. 1918–1922.

*Peterson K. J., Eernisse D. J.* Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequences // *Evol. Dev*. 2001. V. 3. P. 170–205.

*Pearson J. C., Lemons D., McGinnis W.* Modulating Hox gene functions during animal body patterning // *Nat. Rev. Genet*. 2005. V. 6. P. 893–904.

*Tanaka M.* *Evolution of Vertebrate Limb Development* // September 2009. DOI: 10.1002/9780470015902.a0002099

*Turing A. M.* The Chemical Basis of Morphogenesis // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. Aug. 14, 1952. V. 237, № 641. P. 37–72.

*Wellik D. M.* Hox genes and vertebrate axial pattern // *Curr. Top. Dev. Biol*. 2009. V. 88. P. 257–278.

## **ПЛАНИРОВАНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И СБОР ПЕРВИЧНОГО МАТЕРИАЛА**

Получение первичных данных по любому из аспектов биологического знания базируется на корректном сборе материала и правильном применении статистических методов. По этой причине мы используем ряд разделов главы 4 [Хэйек, 2003] из книги «Измерение и мониторинг биологического разнообразия: стандартные методы для земноводных» [Measuring, 1994], написанной ведущими учеными мира.

Успешное решение поставленных задач исследования основывается на репрезентативных выборках из исследуемой популяции – генеральной совокупности. С помощью статистических методов мы получаем обобщенные данные о генеральной совокупности, которые выводятся по выборочным данным, собранным в ходе полевых работ или проведении экспериментальных исследований.

### **Рандомизация**

Основные статистические критерии, применяемые к данным, полученным в ходе исследований по инвентаризации и мониторингу, требуют, чтобы первоначальный выбор объектов исследования, точек сбора материала или применения полевых методик (например, расположение площадок) были случайными. Понятие «случайный» употребляется в исследовательском плане формально: оно относится не к полученным выборочным данным, а характеризует принцип, согласно которому были получены эти данные. Взятие выборки производится случайным образом, если любая возможная группа или комбинация  $n$  групп особей из генеральной совокупности имеет равные шансы войти в реально сделанную выборку. Вопреки распространенному мнению, случайный выбор не означает, что каждая особь в популяции имеет одинаковые шансы попасть в выборку. На практике особей собирают в выборку одну за другой, и каждая из них имеет равные шансы быть выбранной



именно в период сбора. Такую процедуру называют также простым случайным выбором, поскольку после такого сбора не производят выбраковки [Kempthorne, 1955; Cochran, 1963]. При описании процедуры взятия простой случайной выборки подразумевают, что используется ограниченная генеральная совокупность. В случае бесконечной генеральной совокупности случайный выбор не применим и допускается только теоретически.

Многие считают, что взятые случайно выборки высоко репрезентативны, то есть адекватно представляют генеральную совокупность и равноценны ей по всем существенным характеристикам. Второе широко распространенное убеждение состоит в том, что случайные события являются самокорректирующимися. Оба этих допущения неверны и могут влиять на валидность исследования.

## **Репрезентативность выборок**

Закон больших чисел гласит, что выборки большого объема должны репрезентативно представлять совокупность, из которой они взяты, но он ничего не говорит о выборках среднего и малого объема, которые получают в ходе большинства полевых работ. В результате пяти подбрасываний монеты четыре раза может выпасть орел (что составит 89 %) и один раз – решка; однако при 5000 бросаний доля орлов будет близка к теоретическим 50 %. Точно так же пять площадок, расположенных случайным образом в лесу со смыканием крон, 95 % может попасть на четыре небольших водоема и одну тропу; однако местоположение 100 или 1000 площадок будет соответствовать истинному соотношению биотопов данной территории.

Сравнимость случайных распределений по группам – характеристика вероятностная, а не детерминированная. Выборки особей могут сильно варьировать, но распределение этих выборок будет зависеть от свойств генеральной совокупности, из которой они берутся. При фиксированном объеме выборки можно получить относительно более гетерогенные выборки из популяций, особи которых сами по себе более изменчивы. Средние значения и доли, оцененные в больших выборках, будут варьировать меньше, чем в случае малых выборок из той же популяции. Ценность случайного

выбора не является обязательным следствием равномерности или отсутствия смещения, свойственным некоторым выборкам, характеризующим популяцию, однако несмещенность – существенное преимущество больших выборок. Среди величайших заслуг Р. А. Фишера была разработка идеи о том, что случайные процессы можно использовать для достижения равноценности групп еще до начала опыта или исследования. Фактически не требуется проверки значимости того, что устранены все внешние неконтролируемые переменные, которые могут вносить помехи, другими словами – рандомизация оказывает влияние [McGinnis, 1958]. Процесс рандомизации в разумных пределах обеспечивает выполнение условия равноценности выборок, однако отсутствие рандомизации не гарантирует нарушение этих условий.

## Выборочные методы

Все методы характеризуются определенной структурой (распределением) изменчивости. Знание этой структуры – основной инструмент статистических выводов. Эту информацию можно получить на основе законов математической вероятности, которые, в свою очередь, применимы только к выборкам, полученным случайным образом.

Существуют и другие выборочные методы. Некоторые только отчасти соответствуют случайной процедуре, а другие используют отдельные свойства случайных процессов. *Нерепрезентативная выборка* – общий термин для обозначения выборки, используемый скорее для удобства, чем для формальной репрезентативности. Выбор определенной совокупности видов специалистом-герпетологом может точно соответствовать реальной доле этих видов в данной местности. Однако полученные численности могут быть обусловлены неспецифической изменчивостью между выборками, поэтому возможность использования повторностей ограничена. Существует три распространенных типа нерепрезентативных выборок: побочные, взятые наугад и бессистемные. *Побочные выборки* имеют место тогда, когда данные о видах или родах получают неслучайным образом, в качестве побочного продукта более масштабного или несвязанного с данной работой исследования. Такой

метод не гарантирует репрезентативности полученных данных, а также остается не вполне ясным, как установить границы исследуемой популяции.

Кохрэн с соавт. [Cochran et al., 1954] обсуждал использование *взятых наугад* выборок, применяя которые исследователь фактически «берет пригоршней». Будь то отбираемые из наличной генеральной совокупности объекты или карточки со случайными числами – те из них, что попали в «пригоршню», в среднем сходны между собой более чем в случае простой случайной выборки, то есть величина изменчивости занижается. Авторы показали, что если такие «выхватывания» распределены случайно, так что выбранные с их помощью объекты имеют равные шансы попасть в выборку, они все равно не обладают свойствами случайных выборок.

*Бессистемные выборки* повышают равную вероятность, и, к сожалению, их принято считать случайными выборками в случае применения некоторых экологических методик (например, при учетах площадками). Однако, если для выбора географических точек, микробиотопов или точек, в которых будут расположены площадки, не используются специальные приспособления, например таблицы или генератор случайных чисел, может возникать *эффект ореола*. Это явление возникает тогда, когда выбирают «лучшие» или «хорошие» места учетов или экземпляры. Например, лягушку берут уже за границей территории, на которой проводят исследование, только потому, что она обладает ожидаемыми свойствами. Такой метод взятия выборок, несомненно, возможен для увеличения объема выборок или для установления пределов видового обилия. Однако этот метод снижает внешнюю валидность и может влиять на результаты применения статистических критериев.

В отличие нерепрезентативного, *вероятностный выбор* представляет собой процесс, необходимым условием которого является случайность. Рандомизация может быть применена на одном из этапов процедуры взятия выборки. Некоторые из этих методов могут представлять интерес для работ по инвентаризации и мониторингу. При *стратификации* (*послойном случайном выборе*), прежде чем делать выборки, исследуемую популяцию разделяют на относительно однородные группы (страты или

слои), выделяемые по факторам, оказывающим существенное влияние на пределы изменчивости данной популяции (например, пол, размеры, репродуктивное состояние, стадия жизненного цикла). Затем в пределах каждого слоя производят случайную выборку. Эти факторы выбирают по совету специалистов по земноводным. Такая экспертная оценка может быть и неподходящей основой для составления процедуры выборочного метода, но она просто необходима для выделения контролируемых, независимых (по отношению к изучаемому явлению) переменных, и тем самым для повышения внутренней валидности. Послойный случайный выбор – также и эффективная рабочая стратегия проверки отдельных особей, событий или микробиотопов для возможного их исключения из рассмотрения и для снижения неконтролируемой изменчивости.

Рандомизация внутри слоев повышает точность изучения, обеспечивая такое же, как в изучаемой популяции, пропорциональное распределение в выборке земноводных, явлений или микробиотопов. Она увеличивает вероятность репрезентативности исследования по отношению к генеральной совокупности. Послойный случайный выбор применим для популяций, имеющих тенденцию к мозаичному распределению в пространстве [Seber, 1986]. В этом случае каждая выборка объемом  $n$  характеризуется известной вероятностью быть отобранной для изучения. Для этого не нужно знать действительную вероятность выбора, необходимо только иметь данные об отношении этой вероятности к доле таких выборок.

Используя выборочный метод, следует сосредоточивать главное усилие на устранении наиболее важных источников систематической ошибки и случайной ошибки выборки. После минимизации этих ошибок наиболее простой способ повышения точности выборки – это увеличение объема выборки. При прочих равных условиях, ошибка случайной выборки в первом приближении обратно пропорциональна квадратному корню из числа элементов, входящих в выборку [Yates, 1981]. Полученная точность будет зависеть от объема выборки, а также от вариабельности генеральной совокупности объектов, что обуславливает ошибку выборки.

Другие методы, которые подобно простому случайному выбору и послойному случайному выбору, не увеличивают систематическую ошибку, но существенно снижают изменчивость или снижают объем выборки, необходимый для достижения нужного уровня точности, также имеют очевидные преимущества. Один из них – систематический выбор со случайной начальной точкой, в которой выборка берется систематическими, а не случайными методами (например, взятие образцов через равные интервалы в пространстве или во времени). Например, можно выбрать из списка местностей каждую пятую позицию. Еще один метод – групповой выбор, основан на использовании в качестве основной (многошаговой) единицы выбора групп или кластеров (например, прудов, дупел деревьев), а не особей; такой подход может быть предпочтительным в экологических исследованиях, требующих равномерного покрытия территории [Scherba, Gallucci, 1976; Seber, 1986]. Многие авторы (напр., Seber, 1986) отмечали необходимость использования и других выборочных схем, основанных на подходах с большей эффективностью, то есть обеспечивающих снижение вариабельности. Иэйтс [Yates, 1981] и Кребс [Krebs, 1989] опубликовали интересные обсуждения этой проблемы.

Важно понимать, что случайное распределение особей или объектов по группам лишь минимизирует, но не устраняет все угрозы для валидности. Использование такого случайного распределения не гарантирует продуктивность плана исследования или проверяемость гипотезы. Оно обеспечивает «подходящую среду» для получения выводов, но не непогрешимость этих выводов; предположения о возможности сравнения с результатами других работ – не более чем предположение, вероятность которого еще предстоит оценить. Рандомизация – лучший способ избежать случайной ошибки выборки, однако когда численности групп малы, сильные внутренние различия, которые оказывают влияние на оцениваемые эффекты, могут случайно возникать в разных группах [Gilbert, 1989]. И, напротив, путем разумного выбора управляющих переменных [McGinnis, 1958] и использования более утонченных планов взятия выборок, обсуждавшихся выше, можно уменьшить необходимый объем выборки и повысить и внутреннюю, и внешнюю валидность исследования.

## Использование таблиц случайных чисел

Использование таблицы случайных чисел в исследованиях с заранее спланированной схемой взятия выборок, видимо, самый широко распространенный метод получения случайных выборок, рекомендуемый для использования в рамках многих методов, но требующий вместе с тем и корректного применения [Хэйек, 2003].

Для решения задач по инвентаризации и мониторингу первым шагом является составление списка объектов, биотопов, площадок или трансект, подлежащих случайному размещению. Особи, хотя и представляют собой основной объект, на котором сосредотачивается основное внимание, тем не менее не могут быть рандомизированы в полевом исследовании, в отличие от биотопов, в которых они будут изучаться или отлавливаться. Каждой единице в списке приписывается индивидуальный номер. Следующий шаг – выбор из таблицы случайных чисел, в соответствии с которыми будет составлена выборка. Предположим, что мы хотим разместить 10 квадратных площадок (каждая площадью  $1 \text{ м}^2$ ) случайным образом в определенном биотопе, площадь которого  $25 \times 25 \text{ м}$ , то есть  $625 \text{ м}^2$ . Карту территории можно разделить на 25 участков одинаковой площади ( $5 \times 5 \text{ м}$ ) и каждому из них присвоить свой номер, от 1 до 25. Далее предстоит сделать случайный выбор 10 участков, в каждый из которых следует поместить одну из 10 площадок. Для этого мы можем использовать таблицу случайных чисел и выбрать 10 чисел, каждое из которых должно соответствовать одному из 25 участков. Иногда может понадобиться использовать процедуру случайного выбора во второй раз, чтобы подтвердить, что выбранные площадки действительно расположены в случайном порядке. Мы можем таким же способом выбрать еще и «контрольную» группу. Цель – создание двух групп, равноценных в вероятностном смысле. Два набора площадок будут располагаться на участках, представляющих все  $625 \text{ м}^2$  биотопа, выбранного для проведения работы. Использование такой контрольной группы не обязательно означает, что изучаемая генеральная совокупность обладает некоей общей характеристикой или образует биологическую популяцию, представляющую интерес.

В некоторых условиях бывает необходимым использовать другой метод взятия вероятностных выборок. Например, если

изучаемая популяция еще до сбора материала разделена на слои в соответствии с микробиотопами биотопа, расположение площадок в пределах каждого слоя следует выбирать отдельно и с использованием таблицы случайных чисел.

Разделение на слои или блоки до начала исследования желательно производить и в случае коррекции начального случайного распределения по группам [Cook, Campbell, 1979]. Тем не менее, если новые данные по составу фауны указывают на то, что различия в микробиотопах могут иметь важное значение в исследовании, случайный выбор местоположения каждой площадки можно проверить на несравнимость. Например, исследователь мог обнаружить, что в состав семи площадок вошли участки русла быстрой реки, двух площадок – небольшие пруды, а одной – толстый слой сухой подстилки. Если такое уклонение выявлено еще до начала полевой работы, то допустимо проведение «перерандомизации», то есть выбор 10 новых мест. Однако в таком случае разделение на слои или блоки должно быть проведено особенно тщательно. Для достижения максимальной эффективности в плане исследования должна быть оговорена начальная точка проведения рандомизации. Другая обычная процедура случайного распределения по группам отбираемых объектов – это жеребьевка. На листках бумаги пишут номера всех наличных объектов (например, 1, 2, ..., 25), помещают их в контейнер, хорошенько перемешивают и наугад вытаскивают по одному листку до тех пор, пока не будет достигнут нужный объем выборки (например, 10). Этот метод может давать непредвиденное смещение (например, листки прилипают к стенкам контейнера или друг к другу). Можно использовать также таблицы случайных чисел, составленные компьютерной программой, однако каждая программа должна быть протестирована, поскольку в публикациях упоминаются неточности некоторых таких программ.

В качестве необходимых дополнений для обеспечения реальной рандомизации Коннор [Connor, 1977] предложил для обязательного использования следующие процедуры:

1. Случайное распределение по группам – задача одного или нескольких человек, составлявших план исследования и наиболее хорошо знакомых с логическим обоснованием выборочного метода.

2. Контроль за этим распределением осуществляют сами исследователи, а не обслуживающий персонал учреждения.

3. Вся процедура осуществляется один человек, а не группа лиц.

4. Исследователи не ищут лазеек, с применением которых не выполняется условие случайного распределения наличного малого числа особей или объектов (например, исследователь включает в выборку объект, расположенный вблизи, но вне площадки, из-за его желательных характеристик). К тому списку можно добавить еще одно условие:

5. Рандомизацию проводят до начала полевых работ. Такая практика исключает как ненамеренные, так и сознательные источники систематической ошибки при случайном выборе и предотвращает возможность прямой замены особей или площадок на более удобные или подходящие для сбора данных. Выборка из генеральной совокупности высоко репрезентативна только в том случае, когда ошибка, обусловленная процессом выбора объектов в полевых условиях, сведена к минимуму. Но даже наличие такой ошибки, влияющей на все объективные выводы, совсем необязательно снижает ценность всего исследования. Многие временные, постоянные или небольшие отклонения ненаправленны и потому несущественны. Например, если ограниченное отклонение постоянно для различных видов, оно будет оказывать слабое влияние на результаты инвентаризации этих видов в одной точке исследования. Исследователи не должны придавать слишком большого значения отклонениям, вызванным незначительными причинами, что на деле может давать ошибки, сходные с тривиальными выборочными ошибками [Yates, 1981]. В целом же выявление относительной значимости систематических и выборочных ошибок является необходимым компонентом статистических выводов.

## **Независимость**

Применение статистических критериев может быть неправомерным, если изучаемые явления не удовлетворяют условию статистической независимости. Считается, что два события статистически независимы, если вероятность одного из них остается постоянной независимо от того, происходит ли другое. Последовательные



выборки из генеральной совокупности независимы, если вероятность взятия любой из них не зависит от взятия других [Marriot, 1990]. Выборки земноводных, берущиеся с одной площадки одна за другой, можно считать независимыми, если численность популяции высокая. Находки земноводных на трансектах также могут быть независимыми, если особи не обладают очень высокой подвижностью, и, следовательно, не существует вероятности их обнаружения при учетах на различных интервалах трансекты. И, напротив, удаление самцов из хора может влиять на активность вокализации оставшихся, поэтому их уже труднее обнаружить и отловить. Точно так же ночные учеты с помощью автотранспорта, сделанные через короткие промежутки времени, могут не быть независимыми.

Трансекты в местах проведения исследования следует размечать на достаточно большом расстоянии друг от друга, чтобы сделать маловероятным визуальное или звуковое взаимовлияние исследователей, проводящих учеты. При работе с малочисленными популяциями, например, личинками из дупел деревьев или очень мелких водоемов (которые можно обловить одним проходом сачка), уже первый сбор оказывает сильное влияние на взятие следующей выборки, поскольку численность особей резко снижается. В этом случае оставшиеся личинки могут характеризоваться таким значением признака, которое отличается его значения в исходной ненарушенной совокупности. Другой пример возможной причины зависимости – сбор бесхвостых земноводных из водоема только в пределах короткого, легко проходимого маршрута в течение двух последовательных дней. Если пойманных особей не метят и не различают индивидуально, то по меньшей мере некоторые из них (а вероятно, и многие) могут быть включены в обе выборки.

## **Объем выборки**

На стадии планирования обычно возникает вопрос об объеме выборки, минимально необходимом и для применения статистических критериев, и для возможности обобщения результатов. Эта численность собираемых объектов не бывает большой из-за ограниченности исследования во времени, средствах и числе испол-

нителей, но и не должна быть слишком низкой, исходя из статистических и биологических соображений. Поэтому первая задача – определение минимального объема выборки биологических объектов, необходимого для обнаружения статистически надежных результатов.

Необходимость применения статистических критериев на основе рандомизации, оценивания степени сравнимости выборок и их репрезентативности приводит большинство исследователей к убеждению, что «больше» всегда и «лучше». С другой стороны, экологическая литература изобилует доказательствами возможности использования и апологиями малых выборок. Потому афоризм «чем больше, тем лучше» не всегда верен и его соблюдение еще не гарантия успешного использования статистического анализа.

В связи с исследованиями по инвентаризации и мониторингу нам следует рассмотреть по меньшей мере два аспекта проблемы объема выборки: 1) число площадок, трансект или экскурсий, необходимое для исследования на одной территории; 2) число собираемых экземпляров и регистрируемых видов. Соображения по поводу первого аспекта рассмотрены в разделах, касающихся выборочных методов, и здесь мы только отметим два нюанса. Во-первых, в случае простого случайного выбора предполагаемое число площадок, трансект или «пятен» определяется исходя из оценки, которую специалисты считают минимально необходимой для обеспечения репрезентативности в пределах изучаемой территории с точки зрения биологии или экологии. Во-вторых, если применяется послойный выбор, то оптимальным является разумный выбор от одной до трех переменных, по которым производится деление на слои и достигается сравнимость групп вследствие случайного выбора в пределах слоя. Эта методология устраняет проблемы пропущенных (неучтенных) или недоступных особей в большом, многомерном наборе данных.

Определение числа повторностей в полевой работе довольно затруднительно, особенно в том случае, если число посещений территории определяется ограниченностью средств. Хотя исследователь может выбрать модель, формулы для предварительной оценки объема выборки в лучшем случае дают асимптотическое приближение, а не точный результат, а в худшем – указывают на

невозможность получения нужной численности из-за ограничений проведения исследования. Для наших целей более надежным подходом являются рекомендации специалистов. На деле повторное посещение биотопа по стандартному расписанию более важно для успеха проекта, чем предварительный расчет числа посещений.

Другая проблема – число собранных экземпляров или видов. В случае полевых исследований, обсуждаемых в этой книге, предварительное определение необходимого числа видов не есть норма: исследователи обнаруживают столько, сколько их есть. Точно так же в реальной биологической ситуации проведения инвентаризации и мониторинга особи и виды представляют собой предмет исследования, но не отбираемые объекты, и, в отличие от трансект или площадок, случайный выбор не направлен непосредственно на них. Тем не менее после завершения взятия выборок можно установить, какую вероятность подтверждения нулевой гипотезы обеспечивает полученный объем выборки.

Зачастую исследователи довольствуются получением выборки малого объема, а от среднего объема выборки приходят в восторг. Полевые исследования не требуют предварительного использования формул для определения объема выборки; качество результатов полевой работы оценивается только впоследствии. Некоторые авторы [напр., Rotenberry, Wiens, 1985] обсуждают использование формул для определения мощности и необходимого объема выборки в планировании полевых исследований. Я уделяю больше внимания использованию понятий мощности и объема выборки в смысле их интерпретируемости.

## **Оценка ошибок**

Применяя статистический критерий, рассматривают и нуль-гипотезу, и альтернативную ей гипотезу. Нуль-гипотеза гласит, что рассматриваемая переменная не оказывает влияния или взаимосвязь с ней отсутствует, в то время как альтернативная гипотеза предполагает наличие такого влияния или взаимосвязи. В статистическом анализе применительно к биологическим объектам больше внимания уделяется нуль-гипотезе. Кроме того, больший акцент делается на ошибке 1-го рода, иначе называемой альфа-ошибкой. По-другому

альфа-ошибка обычно называется уровнем значимости, выбранным для данной работы; он показывает, какова вероятность отвергнуть гипотезу, если она верна и не должна быть отклонена. Этот уровень, выраженный в интервале от 0 до 1, действительно может считаться случайной переменной или статистикой, измеряющей состоятельность данных, соответствующих нуль-гипотезе. Ошибка 2-го рода, иначе называемая бета-ошибкой, относится к данному критерию и показывает, какова вероятность принять гипотезу, если она ложная и должна быть отклонена (то есть если нуль-гипотеза не может быть «принята»); ошибки этого типа нельзя контролировать путем выбора уровня значимости. Обычно следует заранее устанавливать уровень значимости (ошибки 1-го рода) и минимизировать вероятность ошибки 2-го рода.

Каждая из этих ошибок может дорого стоить; то, какая из двух имеет более сильные и разрушительные последствия, определяется частными деталями применения критерия. Можно привести примеры (в том числе и касающиеся вопросов жизни и смерти), в которых цена неверного предсказания вероятности ошибки 1-го рода была значительно больше, чем последствия совершения ошибки 2-го рода. В таких случаях для принятия решений об отклонении столь серьезной допустимой ошибки следует устанавливать значение альфа на уровне 0,01 или даже 0,001. Когда ошибка не может повлечь за собой таких пагубных последствий, ошибки 1-го рода обычно обходятся не столь дорого, как ошибки 2-го рода. Это особенно верно в случае поисковых работ или в исследованиях с новаторскими элементами или плохо различимыми видовыми влияниями. С другой стороны, Тофт и Ши [Toft, Shea, 1983] отметили те условия проведения фундаментальных исследований, при которых цена ошибки 1-го рода должна быть выше, чем 2-го рода.

### **Соглашение о пяти процентах**

Чтобы сделать разумный выбор об уровне ошибки, следует привлечь подробные данные о возможных потерях. Такое уточнение практически невозможно в общей инвентаризации или работе по мониторингу, поэтому при тестировании гипотез, ос-

нованных на данных такого рода по земноводным, возникают проблемы. В целом же биологи нашли решение проблемы путем принятия для альфа-ошибки согласительного, хотя и произвольного уровня, равного 0,05 (реже 0,01) во всех исследованиях, тем самым фактически игнорируя ошибку 2-го рода и мощность критерия. Уровень альфа, равный 0,05, который обычно упоминается так, как будто является неоспоримой истиной (и даже может определять возможность публикации результатов), является тем не менее результатом договоренности. Использование постоянного значения для альфа (0,05) вносит непредвзятость в процедуру проверки, но может быть серьезным препятствием для интерпретации, поскольку это соглашение игнорирует другие существенные аспекты процесса получения выводов. Кроме того, такая договоренность сводит проблему к величине ошибки, а не к ценности или значению полученных результатов. Решение об использовании фиксированной величины альфа-ошибки не всегда лучшая стратегия для работ, связанных с наблюдением. Выбор попарно связанных значений альфа- и бета-ошибок, основанных на сложном плане взятия выборок, может более адекватно соответствовать целям изучения биоразнообразия. Бета-ошибка должна быть так же важна, как и альфа, чтобы обеспечить одинаковые шансы выявления стандарта для полевых работ, связанных с наблюдением, до тех пор, пока условия не выявят большую цену одной из ошибок или более сложную распознаваемость по сравнению с другой.

### **Мощность, величина эффекта и объем выборки**

Очевидно, что вероятность ошибки 2-го рода, или бета-ошибки (принятие ложной гипотезы) и вероятность корректного отклонения гипотезы (мощность) взаимосвязаны между собой ( $1 - \text{бета-ошибка} = \text{мощность}$ ). Следовательно, именно критерий мощности с высокой вероятностью позволяет утверждать, что имеется реальное различие, когда в популяции действительно существует такое различие. В выводах исследований обычно указывают объем выборки, а также альфа-ошибку или доверительный уровень ( $p$ ), но не упоминается ошибка 2-го рода или мощность критерия. Кроме

того, наблюдаемое значение  $p$  часто является единственным критерием, используя который принимают решение о правильности гипотезы; при этом не обращают внимание ни на объем выборки, ни на план исследования, ни на потенциальную цену принятого решения [Yoccoz, 1991].

Интерпретации результатов работ по изучению земноводных позволяют выявить общее мнение, что достоверные результаты, полученные с использованием выборок большого объема, имеют большее значение и более надежны, чем результаты, полученные на малых выборках. Кроме того, если исследователь делает заключение о существовании статистически достоверной зависимости, он обычно уверен не только в том, что имеющая биологический или экологический смысл зависимость существует в исследованной популяции, но и что степень или величина этой связи или эффекта могут быть выявлены и в других работах. Однако величина эффекта (взаимосвязи или различий) не есть следствие величины объема выборки.

Несомненно, чем меньше значение альфа и наблюдаемой вероятности ( $p$ ), тем больше уверенность в том, что полученный результат не есть следствие ошибки выборки. Однако ни альфа, ни  $p$  не показывают, как сильно различаются параметры (например, средние значения) или какова величина реального эффекта. Величина эффекта [Cohen, 1977] – это относительная мера различия (выраженная в единицах стандартного отклонения), которое ожидают обнаружить в исследовании. Однако в большинстве работ, связанных с наблюдениями, эту величину заранее оценить невозможно. Такие различия выявляются уже после получения данных; наблюдаемая величина эффекта (то есть стандартизованное различие между полученными оценками двух параметров) определяет это различие с помощью данной процедуры или критерия [Cohen, 1977; Lipsey, 1990]. Если нуль-гипотеза отклоняется, это означает, что между ситуациями, определяемыми двумя альтернативными гипотезами, могут существовать реальные различия. Масштаб этих различий может существенно влиять на вероятность полученной достоверности. Чем больше величина эффекта или взаимосвязи для гетерогенных выборок равного объема, тем более вероятно выявление их статистической достоверности и тем

выше статистическая мощность данного критерия. Точно так же с помощью любой переменной (независимо от ее значения) можно обнаружить статистически достоверное различие на выборке достаточно большого объема.

В случае больших выборок выявляемое различие может быть очень малым, но тем не менее статистически достоверным; в случае малых выборок это различие должно быть достаточно большим (однако, как мы покажем далее, необязательно реально существующим), чтобы его можно было обнаружить. Для оценки выявляемого различия необходимо знать не только его достоверность, но и величину.

При приблизительно равных объемах выборок можно оценить величину максимального наблюдаемого различия (выраженного в подходящей мере величины эффекта) между группами, которое считается недостоверным, и величину различия между этими же группами, которое будет считаться статистически достоверным. Наблюдаемая величина эффекта для первой группы никогда не бывает больше, чем любая величина эффекта во второй группе. Не составляет труда понять значение этого стандарта как минимальной основы для того, чтобы избежать получения нелогичных интерпретаций.

В экспериментальных сериях и даже в некоторых изыскательских исследованиях бывает возможным установить минимальную величину эффекта или минимальную величину различия до начала проведения работ. Это значение, определенное а priori либо на основании мнения экспертов [Cohen, 1977], либо по результатам предварительных исследований [см., напр., Ferrari, Hayek, 1990], используется в формулах, по которым определяют величину эффекта и объем выборки.

Менее распространено мнение, что проверка нуль-гипотез не самая подходящая процедура для полевых исследований. Тем не менее во многих случаях проблемы интерпретаций и неоднозначностей могут быть успешно разрешены или устранены с помощью построения альтернативных гипотез. Если величина анализируемого эффекта включена в формулировку научной гипотезы, то простые статистические критерии могут стать только одним из аспектов общего подхода статистических выводов. Например, ис-

следователь может оценить, понизилась ли со временем численность тигровой амбистомы (*Ambystoma tigrinum*) по меньшей мере на 10 %; или различается ли длина тела рисовой лягушки (*Rana limnocharis*) из двух точек по меньшей мере на одну стандартную единицу. Таким образом, применяются знания и опыт, накопленные специалистами, а проверяемые точными методами условия приобретают биологический смысл. Уровень статистической достоверности имеет отношение к доверительному интервалу, который используется для принятия окончательного решения, а оценка доверительного интервала может иметь более общее значение. И что более важно, результат больше нельзя будет спутать с собственно величиной эффекта, а нереальный эффект не будет подвергнут проверке.

При изучении корреляции исследователи обычно приводят значения величины эффекта, называя ее коэффициентом детерминации (квадрат коэффициента корреляции). В этом случае авторы работ, по всей видимости, признают, что коэффициент корреляции, его достоверность и уровень вероятности не характеризуют величину взаимосвязи. Значение величины взаимосвязи остается неопределенным в работах, связанных с наблюдениями (а также в экспериментальных исследованиях), когда проверка нулевой гипотезы является единственным методом получения статистически корректных выводов.

Когда возникает вопрос о необходимом объеме выборки, обычно считают, что 25 (или 30, или 50, или 100) – достаточная численность, обеспечивающая статистически корректные результаты. Обычно это число выбирают таким, чтобы была сравнительно низкой ошибка среднего, но этот выбор никак не связан с соображениями мощности критерия. Выбор объема выборки на этой основе может стать довольно сложной проблемой.

Поскольку работы по инвентаризации и мониторингу связывают прежде всего с выявлением важных изменений в биоразнообразии с течением времени (особенно в случае его сокращения), следует, по возможности, применять наиболее мощные критерии. Рекомендации по дальнейшему изучению территорий, фаун или видов будут зависеть от выявленных уровней мощности. На основе недостоверных результатов, полученных в тщательно спланиро-



ванных исследованиях с большими объемами выборок, минимизирующими снижение внутренней и внешней валидности, не обязательно (вероятно, вопреки авторитетному мнению) делать вывод о прекращении данного исследования. Лучшая рекомендация в этом случае – провести повторное обследование со взятием выборок по более мощному плану, и уже потом принимать решение о свертывании работ в данном магистральном направлении. Боренштейн и Коэн [Borenstein, Cohen, 1988] приводят программы для вычисления мощности и определения объемов выборок, необходимых для повышения мощности.

Если наблюдаемая величина эффекта большая, а объем выборки достаточен для ее определения, то можно легко оценить доверительный уровень недостоверных результатов (основанный на альфа-ошибке). Если же наблюдаемая величина эффекта небольшая и/или объем выборки недостаточен для ее определения, то работу следует продолжить. Если вычислены и мощность, и наблюдаемая величина эффекта, читатель может принять обоснованное заключение о популяции, а автор публикации – разумно ограничить интерпретации и рекомендации.

Любая процедура статистического тестирования содержит в себе изрядную долю субъективности, что часто игнорируется при использовании общепринятых методов анализа данных по земноводным. Рассмотрение и включение в публикации значений наблюдаемой величины мощности, наблюдаемой величины эффекта, уровня значимости и объема выборки должно ослабить тенденцию рассмотрения результата статистической проверки гипотезы как окончательного вывода для данного исследования. Субъективность, заключенная в процедурах статистического оценивания, требует, чтобы исследователь решил, имеет ли смысл биологическая суть дела, выявляемая методами статистики. Джилберт [Gilbert, 1989] подчеркивал, что должны быть достойными изучения и величина биологического эффекта, и его подоплека. Уровень вероятности, указывая лишь на необходимость отклонения гипотезы, не может предоставить такой информации. Статистический критерий отвечает лишь на поставленный вопрос; задача же исследователя – удостовериться, что выявленная с его помощью зависимость имеет отношение к биологической реальности.

## Статистическая значимость и реальная достоверность

Если быть точным, классическое статистическое оценивание дает обоснованные ответы только в контексте долговременных последствий, однако при исследовании биоразнообразия земноводных часто требуется получить ответ сразу по завершении мониторинга. Например, если установлено (при доверительном уровне 95 %), что один биотоп населен достоверно меньшим числом видов, чем другой, статистический вывод позволяет лишь утверждать, что если из того же самого биотопа брать все новые и новые выборки, то в среднем только в пяти случаях из 100 различия (как результат только лишь случайных событий) будут такими же, как и реально наблюдаемые в другом биотопе, или сильнее. К сожалению, нет способа узнать, представляет ли собой данная серия результатов один из подобных случаев.

Исключительное доверие к критериям значимости без использования других способов получения выводов (например, получение оценки доверительного интервала) не дает возможности выявить взаимосвязь между собственно результатами наблюдений и величиной анализируемых эффектов. Обычно еще до начала сбора данных подразумевают, что нуль-гипотеза об отсутствии различий неверна [см., напр., Savage, 1957]. Никто из специалистов по земноводным не может в действительности допускать возможность сильной нуль-гипотезы, то есть предполагающей абсолютное равенство двух средних. Системы, изучаемые в полевой биологии, слишком подвержены помехам, чтобы допустить такое полное равенство. Даже несмотря на то, что биологи понимают это интуитивно, они продолжают проверять подобную нуль-гипотезу, как если бы она выражала реальные и значимые различия (нуль), и во многих книгах проверка нуль-гипотезы преподносится как единственная возможность [см., напр., Siegel, 1989].

Статистическое тестирование отражает только объем выборки и мощность критерия, но не биологические аспекты, связанные с гипотезой.

Существование специфических эффектов, имеющих биологическое значение, следует выявлять с помощью опытных серий (в том числе и временных), которые должны быть достаточно большими

для того, чтобы их можно было анализировать с помощью мощных критериев. С помощью простых графических построений часто можно оценить, насколько содержательна предполагаемая зависимость. Интересно, что большинство людей согласно с тем, что приблизительно 5 из 100 (при доверительном уровне 0,05) экспериментов с подбрасыванием монеты будут демонстрировать долю «орлов», отличающуюся от 0,50. Если перейти от этой ситуации к проверке наличия экологического эффекта, интересующего исследователя, то большинство людей даст иную интерпретацию: полученный уровень значимости недостаточен для подтверждения первоначальной гипотезы и публикации полученных результатов. Иногда в качестве альтернативной гипотезы выдвигается предположение о возможности выявления крайне маловероятного события с помощью максимума приложенных усилий, другими словами, если вы достаточно упорны в поисках некоего различия, то вы его найдете.

Применение простых критериев значимости может предотвращать возможные ошибки при выявлении величины эффектов любыми способами проверки гипотез. Это поможет избавиться от несопоставимости результатов. Величину эффекта можно оценить как функцию различия между средними или как долю объяснимой изменчивостью (факторную компоненту дисперсии), либо ее можно выразить в виде коэффициента бисериальной корреляции [Cohen, 1977; Lipsey, 1990]. Чтобы предоставить возможность интерпретации результатов, авторы публикаций всегда должны указывать объем выборки, уровень значимости и мощность использованного статистического критерия, величину влияния, оказываемого на изучаемую переменную [см., напр., Cohen, 1977], а также желательно – наблюдаемый уровень вероятности. Величины ошибок 1-го и 2-го рода и вычисленные критерии должны служить основой для сравнения результатов изучения выборок различного объема.

Современные сложности в развитии биологической науки связаны именно с трудностями компактного описания того громадного материала, который легко накапливается в результате наблюдений. Проблема в том, что биологические явления нужно описывать не в терминах необходимости, а в терминах случайности. Случайность в биологии устроена так, что решающую роль играют маловероятные события. Теория вероятностей и ма-

тематическая статистика, оказались не подготовлены к встрече с подобными необычными структурами. Все наши генераторы случайных чисел несовершенны – истинно случайной последовательности они не дают. До сих пор нет математической модели генератора случая, которым задается биологическая эволюция [Налимов, 1979]. Поэтому необходимо понимать условность любых математических приемов, используемых в интерпретации биологического материала.

### Библиографические ссылки

*Налимов В. В.* Теоретическая биология? Ее все еще нет... // Знание – сила. 1979. № 7. С. 9–11.

*Хэйек Л.-Э.* Планирование количественных исследований земноводных // Измерение и мониторинг биологического разнообразия: стандартные методы для земноводных. Гл. 4. / пер. с англ. М.: Изд-во КМК, 2003. С. 21–42.

*Borenstein M., Cohen J.* Statistical Power Analysis: A Computer Program. Lawrence Erlbaum, Hillsdale, New Jersey, 1988.

*Cochran W. G.* Sampling Techniques. (2nd ed.) Wiley, New York, 1963.

*Cochran W. G., Mosteller F., Tukey J. W.* Principles of sampling I. Samples and their analysis // J. Amer. Statistical Assn. 1954. V. 49. P. 13–35.

*Cohen J.* Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. Academic Press, New York, 1977.

*Connor R. F.* Selecting a control group an analysis of randomization process in twelve social reform programs // Evaluation Quart. 1977. V. 1. P. 195–244.

*Cook T. D., Campbell D. T.* Quasi-experimentation, Design and Analysis Issues for Field Settings. Rand-McNally, Chicago, Illinois, 1979.

*Ferrari F., Hayek L. C.* Monthly differences in the distributions of sex and asymmetry in a looking-glass copepod: *Pleuromamma xithas* of Hawaii // J. Crustacean Biol. 1990. V. 10. P. 114–127.

*Gilbert N.* Biometrical Interpretation: Making sense of statistics in biology (2nd ed.). Oxford Univ. Press, Oxford, 1989.

*Kemphorne O.* The randomization theory of experimental inference // J. Amer. Statistical Assn. 1955. V. 50. P. 946–967.

*Krebs C. J.* Ecological Methodology. Harper Row New York, 1989.

*Lipsey M. W.* Design Sensitivity. Sage Publ., Newbury Park, California, 1990.

*Marriot F. H.* A Dictionary of Statistical Terms. Longman Group, Essex, England, 1990.

*McGinnis R.* Randomization and inference in sociological research // Amer. Sociological Rev. 1958. V. 23. P. 408–414.

Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians / W. R. Heyer, Maureen A. Donnelly, R. W. McDiarmid, C. L.-A. Hayek, M. S. Foster (eds.). Washington & London, Smithsonian Institution Press, 1994. 364 p.

*Rotenberry J. T., Wiens J. A.* Statistical power analysis and community-wide patterns. Amer. Nat. 1985. V. 125. P. 164–168.

*Savage I. R.* Non-parametric statistics // J. Amer. Statistical Assn. 1957. V. 52. P. 331–344.

*Scherba S. Jr., Gallucci V. F.* The application of systematic sampling to a study of infauna variation in a soft substrate environment // Fishery Bull. 1976. V. 74. P. 937–948.

*Seber G. A. F.* A review of estimating animal abundance // Biometrics. 1986. V. 42. P. 267–292.

*Siegel S. J.* Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill, New York, 1989.

*Toft C. A., Shea P. J.* Detecting community-wide patterns: Estimating power strengthens statistical inference // Amer. Nat. 1983. V. 122. P. 618–625.

*Yates F.* Sampling Methods for Censuses and Surveys (4th ed.). Macmillan, New York, 1981.

*Yoccoz N. G.* Use, overuse, and misuse of significance tests in evolutionary biology and ecology // Bull. Ecological Soc. America. 1991. V. 72. P. 106–111.

## СТРУКТУРЫ БАЗ ДАННЫХ

Кроме ведения полевых дневников, карточек, лабораторных журналов, заполняемых традиционным способом (рукописно, простым карандашом), подразумевается создание на основе содержащейся в них первичной информации электронных таблиц. Ниже мы приводим описание возможной организации базы первичных данных по аномалиям (табл. 1), а также базы по метаанализу (табл. 2):

Автор

1-й соавтор

2-й соавтор

N соавтор

Год

Название

Издание

Номер, том

Страницы

Редактор

Название книги

Издательство

Место издания

Таксономическая позиция

Тематика статьи

Упомянутые аномалии

Дополнительная информация

Организация первичных баз данных как для фактического, так и для литературного материала должна основываться на принципах простоты, последовательности и логики с тем, чтобы они были легко понятны каждому пользователю. Главная (первичная) цель состоит в том, чтобы обеспечить возможность использования файлов в дальнейшем, в различных системах электронных баз данных в течение обозримого будущего. Наиболее обычный и легкоконвертируемый формат – Excel (.xls).

Исходная электронная таблица не должна быть многострочной, содержать большое количество дополнительных, искусственных, перегружающих элементов и не должна содержать результа-

тов их анализа и синтеза (обобщающих цифр, графиков, рисунков), место которым в статьях, посвященных этим вопросам. При желании такая информация может быть помещена в файлах сопроводительного (пояснительного) текста, прилагающегося к первичной базе ее автора.

Файл в формате лист Excel (.xls) содержит сведения, включающие информацию по каждому из отловленных (обследованных) индивидов. Данные заносятся последовательно, в порядке слева направо в каждую из колонок:

«Коллекционный №» – номер экземпляра в коллекции (регистрационной карточке, журнале); «Вид» – видовая принадлежность (латинское видовое название); «Местообитание» – местообитание, где собран данный экземпляр; «Дата» – дата сбора в формате: «Дата. Месяц. Год»; «Возраст/стадия» – генеративный возраст (Juv. – сеголеток, S.ad. – неполовозрелая особь, Ad. – половозрелое животное; стадия развития для личинки – с указанием, по какому автору (например, по Н. В. Дабагян и Л. А. Слепцовой, по А. Limbauch и E. P. Volpe; или по К. L. Gosner и т. п.); «Пол» – половая принадлежность особи (если возможно ее установить); «Морфа» – морфа (окрасочная морфа, если таковая имеется); «ΣN аномалий» – суммарное количество отмеченных у данной особи аномалий.

Далее в порядке от головного отдела тела к заднему (хвостовому) каждая из последующих колонок озаглавлена в соответствии с принятой классификацией аномалий (см. раздел «Классификация внешних морфологических аномалий бесхвостых амфибий» и *Приложение 1*).

Таблица 1

Пример организации базы данных по аномалиям

Коллекционный №	Вид (латынь)	Местообитание	Дата	Возраст/стадия	ΣМ аномалий	Брахицефалия	Прочие аномалии по классификации
125	Rana arvalis	р. Камышенка (3)	11.06.2014	Ad	3	1	2





## КЛАССИФИКАЦИИ АНОМАЛИЙ

### Принципы классификации аномалий

Девиантные морфологические формы нередко называют уродствами или аномалиями, хотя граница между нормой и патологией весьма условна [Wolf, 1976; Tyler, 1989]. Как мы отмечали выше, совокупность особей, представляющих «норму», и совокупность вариантов, составляющих крайние (уклоняющиеся или девиантные) формы, принадлежат одному единому множеству [Вершинин, 2009], которое и представляет собой всю индивидуальную изменчивость. Если животное, имеющее морфологические отклонения, жизнеспособно, доживает до половозрелости, участвует в размножении и оставляет жизнеспособное потомство [Борхвардт, 1983; Балахонов, 1990], то его вряд ли можно называть «уродом».

Дословно термин «аномалия» означает «не норма», то есть все варианты строения, отличающиеся от нормы по каким-то признакам. Традиционно под этим понимали не любое отклонение от нормы, а существенное изменение строения. Для обозначения «крайне аномальных» вариантов строения употребляли термин «уродства», понимая под этим еще большую степень отклонения от нормы, чем аномалия. Между нормой и аномалиями существует некоторое множество вариантов, которые составляют индивидуальную изменчивость [Коваленко, 2000].

Основываясь на определении А. А. Королькова и В. П. Петленко [Корольков, Петленко, 1977] о том, что живая система в норме коадаптирована, адаптирована к среде и конкурентоспособна, нормой является все, что жизнеспособно [см.: Коваленко, 2003].

На сегодняшний день нет общепринятых критериев, по которым разграничиваются понятия нормы, аномалии и уродства, но попытки дать определение этим понятиям предпринимались неоднократно. Предлагались различные критерии, но ни один из них не позволил ни строго определить, ни формализовать понятия нормы, изменчивости, аномалии и уродства [Вершинин, 1997].

Так, Е. Е. Коваленко предлагает брать за критерий разделения нормы и аномалии показатель частоты встречаемости признака [Коваленко, 2003]. По характеру проявления аномалий Е. Е. Коваленко вводит понятие «фоновых» и «массовых» [Коваленко, 2000]. «Массовыми» считаются аномалии, если процент аномальных особей в данной выборке достаточно высок (проявляются как минимум у 50 % особей). «Фоновыми аномалиями» считаются «варианты строения, отличные от нормы, но постоянно проявляющиеся на ее фоне в оптимальных условиях развития». Тем же автором был предложен новый критерий для констатации факта массового проявления аномалий [Коваленко, 1992]. Показано, что первые из них не могут служить надежными индикаторами неблагоприятных условий развития, так как «фоновые» аномалии не зависят от естественных лимитирующих факторов. Известно, что феномен массовых аномалий, как и наличие фоновых отклонений [Коваленко, 2000], в популяциях амфибий не всегда является свидетельством ухудшения качества среды [The effect of trematode infection..., 1999; Glanz, 1999]. Факт наличия аномалии строения еще не говорит о неблагоприятных условиях развития [Коваленко, 2000]. В связи с чем предложено понятие «естественные аномалии» [Коваленко, 1992], то есть такие, которые получены без какого-либо намеренного экспериментального вмешательства в ход онтогенеза. «Естественные» аномалии постоянно проявляются у небольшой доли особей как в лабораторных сериях, так и в природных популяциях [Коваленко, 2000].

Е. Е. Коваленко описывает примеры изменчивости посткраниального скелета в оптимальных (или в близких к ним) условиях развития, то есть в лабораторных условиях [Коваленко, 1992]. По мнению Е. Е. Коваленко, традиционные количественные методы могут неадекватно отражать встречаемость скелетных аномалий бесхвостых амфибий [Коваленко, 1992]. В современный период глобальных изменений в биосфере планеты для объективной оценки популяционных и микроэволюционных процессов и их роли в адаптациогенезе биоты к меняющимся условиям среды необходим взгляд на проблемы изучения изменчивости биологических признаков без «шор», требующих отсека девиантных форм [Коваленко, 2000].

Исследования в лабораторных условиях позволили сформулировать основные положения относительно закономерностей изменчивости посткраниального осевого скелета бесхвостых амфибий и составить полные спектры его реальной и потенциальной изменчивости вида или группы видов [Коваленко, 2000]. Важным моментом является то, что видоспецифичность как нормальных, так и девиантных вариантов складывается не из состояния отдельных признаков, а из их комбинаций [Коваленко, 2000].

По понятным причинам спектры и варианты aberrantных форм лабораторных группировок и природных популяций будут существенно различаться. Поэтому изучение аномалий в природных условиях позволяет оценить роль экологической составляющей онтогенетических процессов и ее влияния на изменчивость, специфику процессов адаптации- и морфогенеза в условиях антропогенной дестабилизации среды.

Только исследуя полный спектр изменчивости и частоты всех реализованных вариантов, можно получить адекватное представление о специфике процессов формообразования в меняющихся условиях среды современных экосистем.

Аномалии подразделяются на внешние (экстерьерные, то есть выявляемые при наружном осмотре частей тела и органов) и внутренние (например, скелетные или гистологические, выявляемые только с использованием специальных гистологических методов).

Также они отличаются по происхождению: онтогенетические (возникающие за счет изменений в экспрессии генов при внешних средовых воздействиях, метилировании и пр.), генетические (наследственные) за счет изменения основной последовательности, то есть мутации, регенеративные (у хвостатых в течение всей жизни [Вершинин, 2012]), а у бесхвостых до достижения дефинитивных стадий развития), травматические в результате воздействия хищников или других внешних воздействий, паразитарные – за счет воздействия паразитов на морфогенез, а также как следствие заболеваний.

Разумеется, выявить конкретные причины появления отдельных девиантных форм затруднительно, поскольку морфозы и внешние проявления мутаций нередко фенотипически идентичны. Аномалии могут быть генетически обусловлены (мутации)

или спровоцированы целым рядом факторов (фенокопии) при их внешней похожести [Северцова, Северцов, 2001]. По мнению А. Дюбуа, генетическая природа аномалий не всегда доказуема, во многих случаях она просто «продублирована» [Dubois, 1979]. Не обнаружено прямой связи между типом аномалии и ее природой, то есть по фенотипу нельзя судить о наследственном или ненаследственном характере нарушений.

Существует ряд аномалий-синдромов, представляющих функциональное сочетание комплекса особенностей, явлений или характеристик в основе которого лежит определенная генетическая или негенетическая причина.

Появление синдромов связано с высокой интегрированностью процесса онтогенеза [Рэфф, Коффмен, 1986]. Плейотропное действие изменения одного гена обуславливает цепь морфологических и физиологических изменений [Nachtsheim, 1950], проявляющихся сочетанно (например, аномалия Пельгера). Аналогичные аномалии известны и у амфибий – аномалия *P*, синдромы неподвижных конечностей [Rostand, 1971; Dubois, 2014; Коваленко, 2000]. При работе с ними необходимо помнить, что дефинитивный облик как структурных, так и окрасочных признаков определяется внутригеномными взаимодействиями и уровнем экспрессии генов в конкретных условиях (см. раздел «Основы методологии»).

Различают аномалии разных этапов жизненного цикла: аномалии гамет, икры (кладок и яиц), эмбрионов, личиночные, сеголеток и взрослых особей (дефинитивного облика).

Для каждого из этих периодов требуется отдельная классификация девиантных форм и существуют свои методы их изучения.

## Библиографические ссылки

*Балахонов А. В.* Ошибки развития. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 280 с.

*Борхвардт В. Г.* Адаптивность, отбор и направленная эволюция // Вестн. ЛГУ. 1983. Т. 21. Вып. 4. С. 6–16.

*Вершинин В. Л.* Девиантные формы морфологической изменчивости амфибий как метод исследования микроэволюционных процессов // Экология в высшей школе: синтез науки и образования : материалы Всерос.

науч.-практ. конф. 30 марта – 1 апреля 2009 г. Ч. 1. Челябинск: Изд-во Челяб. гос. пед. ун-та, 2009. С. 13–19.

*Вершинин В. Л.* Хвостатые земноводные Среднего Урала как индикатор антропогенных преобразований среды // Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участием. Нижний Тагил, 26–29 марта 2012 г. Ч. 1 / отв. ред. Т. В. Жуйкова, О. В. Полявина, О. В. Семенова, О. А. Тимохина ; Нижнетагил. гос. соц.-пед. акад. Нижний Тагил: НТГСПА, 2012. С. 81–82.

*Вершинин В. Л.* Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 1997. 47 с.

*Коваленко Е. Е.* Аномалии позвоночника бесхвостых амфибий. СПб., 1992. 142 с.

*Коваленко Е. Е.* Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 117 с.

*Коваленко Е. Е.* Эффект нормы признака и его теоритическое значение // Эволюционная биология: история и теория. СПб., 2003. Вып. 2. С. 66–87.

*Корольков А. А., Петленко В. П.* Философские проблемы теории нормы в биологии и медицине. М.: Медицина, 1977. 391 с.

*Рэфф Р., Коффмен Т.* Эмбрионы, гены и эволюция / пер. с англ. М.: Мир, 1986. 404 с.

*Северцова Е. А., Северцов А. С.* Влияние химического состава воды из естественных водоемов на гастрюляцию травяной лягушки, *Rana temporaria* (Anura, Amphibia) // Зоол. журн. 2001. Т. 80, № 8. С. 986–996.

*Dubois A.* Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana "esculenta"* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. zool. Mus. Berlin. 1979. Pl. 1, № 55. P. 59–87.

*Dubois A.* The anomaly P in palaeartic green frogs of the genus *Pelophylax* (Ranidae) // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды : материалы Международ. школы-конф., Екатеринбург, 23–26 сентября 2013 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 96–104.

*Nachtsheim H.* The Pelger-anomaly in man and rabbit // J. Hered. 1950. V. 41. P. 131–137.

*Rostand J.* Les étangs à monstres. Histoire d'une recherche (1947–1970). Paris: Éditions Stock, 1971. 89 p.

Glanz J. A trematode parasite causes some frog deformities // Science. 1999. № 5415. P. 731–733.

The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship / P. T. J. Johnson, K. B. Lunde, E. G. Ritchie, A. E. Launer // Science. 1999. 284, № 5415. P. 802–804.

Tyler M. J. Australian frogs / Penguin Books Australia Ltd., 1989. P. 163–187.

Wolf E. Les origines et les acquisitions recentes de la teratologie // Bul. de la soc. zool. de France. 1976. V. 101, № 5. P. 835–849.

## Аномалии икры и кладок амфибий

(по: Вершинин, 1989; Вершинин, 1990а; Вершинин, 1990б; Вершинин, 1995; Вершинин, 1997; Вершинин, 2000; Vershnin, 2002)

1. Множественное яйцо (в одной белковой оболочке находится 2–5 яиц).

2. «Четочные» яйца (яйца в кладке соприкасаются, располагаясь тяжами, и не имеют индивидуальных белковых оболочек).

3. Депигментированные (альбинические яйца [Brigitte, 1997]).

4. Яйцо с кровью (зародыш в яйце окружен кровавой пленкой).

5. Редуцированные по размеру яйца (яйца в кладке сморщенные, аномально малы и не развиваются).

6. Диспергированное вещество яйца (вещество яйца диффузно равномерно распределено в пределах наружной гелевой оболочки).

7. Кладки с аномально низким числом яиц.

8. Икринка без яйца (состоит из внешней гелевой оболочки и внутренней мембраны эмбриона).

9. «Пустые» кладки (полностью состоящие из икринок без эмбрионов, см. п. 8).

10. Асимметрия кладки, обычно состоящей из двух шнуров с примерно равным числом яиц (для *Salamandrella keyserlingii*).

11. «Коагулированные» кладки (гелевые оболочки яиц матовые, не набухают, остановка развития).

У сибирского углозуба аномальной считается кладка с числом яиц в одном шнуре менее 20 [Вершинин, 1997]. Так как самка откладывает два примерно равных по числу яиц шнура, рассчитывается асимметрия кладки. Асимметрия (в долях) определяется как разность

первого и частного от деления количества яиц в меньшем по числу икринок шнуре на больший [Басарукин, Боркин, 1984]. Возможно выразить степень асимметрии в процентах (умножением на 100).

### Библиографические ссылки

*Басарукин А. М., Боркин Л. Я.* Распространение, экология и морфологическая изменчивость сибирского углозуба *Hynobius keyserlingii* на острове Сахалин // Труды Зоол. ин-та АН СССР. 1984. Т. 124. С. 12–54.

*Вершинин В. Л.* Аномальные кладки амфибий на территории городской агломерации // Экология. 1990а. № 3. С. 61–66.

*Вершинин В. Л.* Воздействие антропоических факторов и охрана вида // Сибирский углозуб. Экология, поведение, охрана. Т. 2. Гл. 14. М.: Наука, 1995. С. 191–196.

*Вершинин В. Л.* Изменчивость числа яиц в кладках сибирского углозуба в зоне рекреации // Вопросы герпетологии. Киев, 1989. С. 45–46.

*Вершинин В. Л.* О состоянии популяций сибирского углозуба в лесопарковом поясе Екатеринбурга // Экология и рациональное природопользование на рубеже веков. Итоги и перспективы. Томск, 2000. Т. 1. С. 88–89.

*Вершинин В. Л.* Уровень рекреационной нагрузки и состояние популяций сибирского углозуба // Животные в условиях антропогенного ландшафта. Свердловск: УрО АН СССР, 1990б. С. 10–18.

*Вершинин В. Л.* Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 1997. 47 с.

*Brigitte B.* Temporärer Albinismus bei der Erdkrote (*Bufo bufo*) // Z. Feldherpetol. 1997. V. 4, № 1–2. S. 212–214.

*Vershinin V. L.* Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // Ecological specificity of amphibian populations. Advances in amphibian research in the former Soviet Union. V. 7. Pensoft Publishers. Moscow – Sophia, 2002. P. 1–161.

### Патологии развития эмбрионов остромордой лягушки, *Rana arvalis*

(по: Куранова, 1998, 2003; Савельев, 1993)

Для выявления патологий развития на разных стадиях онтогенеза фиксировали икру, личинок и сеголеток остромордой

лягушки в 10 %-м растворе формальдегида. При описании морфологических аномалий развития использована классификация С. В. Савельева [Савельев, 1993].

Для ранних стадий развития использованы методы анализа состояния внутренних органов при помощи интерференционной микроскопии и дифференциального окрашивания тканей. Для личинок и сеголеток на более поздних стадиях развития применяли метод серийных макросечений с шагом в 1 мм. Разрезы контрастировали крезилвиолетом (0,1 %) в уксусной кислоте (рН 2,7) и исследовали в отраженном свете. При анализе ранних стадий развития использовали 36 основных критериев структурной организации эмбриона.

Часть материала была использована для гистологических исследований. При гистологической обработке использовали проводку и заливку материала в парафин через 1,4-диоксан. Серийные срезы толщиной 10 мкм окрашивали с шагом между ними в 100 мкм. Для изучения состояния органов использовали полихромную окраску по Маллори с докрасшиванием ядер кислотным фуксином. Окрашенные срезы заключали в бальзам или глицерин.

Выявлены следующие аномалии развития эмбрионов:

1. Аномалии дробления и гастрюляции.
2. Остановка развития на стадиях дробления и гастрюляции.
3. Остановка развития на стадиях нейруляции и хвостовой почки.
4. Нарушение нейруляции.
5. Эктопия закладок обонятельных плакод.
6. Эктопия головных присосок.
7. Атипичное развитие жаберного аппарата.
8. Гипоплазия жабер.
9. Ассиметричная закладка сомитов.
10. Нарушение сегментации сомитов.
11. Незаращение кишечного-мозгового канала.
12. Агенезия хвоста.
13. Гипоплазия хвоста.
14. Некроз плоточной энтодермы и головного мозга.
15. Гипотелоризм.
16. Анэнцефалия.



17. Циклопия.
18. Агенезия кожи.
19. Новообразования в коже.
20. Отсутствие пигментных клеток эктодермы.
21. Редукция закладок жаберного аппарата.

Еще одним из индикаторных параметров является высокая асинхронность развития эмбрионов в кладке. Подобные нарушения развития свидетельствуют о наличии тератогенных воздействий.

Терминология:

- *агенезия*: полное отсутствие или остановка развития органа на ранних эмбриональных стадиях;
- *аплазия*: врожденное отсутствие органа с наличием его сосудистой ножки;
- *анемия*: нарушение в системе кроветворения (недостаток кроветворения);
- *аутолиз*: разложение зародыша или отдельного органа;
- *анэнцефалия*: недоразвитие головного мозга или отсутствие его;
- *гетерохрония*: неравномерное развитие органов или их частей;
- *гидроцефалия*: врожденная водянка головного мозга – чрезмерное накопление в вентрикулярной системе или под паутинным пространством спинномозговой жидкости;
- *гипотелоризм*: несоответствие размеров тела данной стадии развития (уменьшение размеров);
- *гипоплазия*: недоразвитие органа или его части, уменьшенные размеры по сравнению с нормой;
- *некроз*: отмирание тканей, свидетельствующее о начале гибели органа;
- *эктопия*: аномальное расположение органа или его частей, иногда с выходом на поверхность тела.

### Библиографические ссылки

Куранова В. Н. Фауна и экология земноводных и пресмыкающихся юго-востока Западной Сибири : дис. ... канд. биол. наук. Томск, 1998. 411 с.

Куранова В. Н. Антропоическое воздействие на земноводных и пресмыкающихся. Проблемы их охраны на юго-востоке Западной Сибири //

Амфибии и рептилии в Западной Сибири: сохранение биоразнообразия, проблемы экологической этики и экологического образования. Новосибирск, 2003. 39–51.

Савельев С. В. Монстры // Природа. 1993. № 10. С. 55–68.

### Аномалии личинок амфибий

1. Бицефалия.
2. Анэнцефалия.
3. Микрофтальмия.
4. Анофтальмия (симметричная и асимметричная) [Рэфф, Коффмен, 1986; Xenbase]
5. Аномалии ротового аппарата (роговых челюстей, губ и губных зубов у бесхвостых амфибий) [Вершинин, 2007; Occurrence of Oral..., 2007; Trubetskaaya, 2006].
6. Атипичное формирование жаберного аппарата и оперкулярной камеры (у бесхвостых амфибий) [Вершинин, 2009].
7. Сколиоз (лордоз, кифоз) [Cooke, 1981].
8. Аномальная закладка поясов конечностей (вплоть до полного их отсутствия).
9. Депигментированные или слабопигментированные кожные покровы [Brigitte, 1997].
10. Необычные цветовые варианты пигментации кожных покровов [Brigitte, 1997].
11. Кожные новообразования (меланомы и пр.).
12. Отек брюшной полости [Вершинин, 1989; Vershnin, 2002a].
13. Грыжа (выпячивание органов за стенку тела).
14. Неотения [Vershinin, 2002б].
15. Гигантизм [Боркин и др., 1981; Мильто, 2011; Borkin et al., 1984].

### Библиографические ссылки

Боркин Л. Я., Бергер Л., Гюнтер Р. О гигантских головастиках зеленых лягушек комплекса *Rana esculenta* // Фауна и экология амфибий и рептилий Палеарктической Азии. 1981 : Труды Зоолог. Ин-та. Т. 101. Л., 1981. С. 29–47.

*Вершинин В. Л.* Морфологические аномалии амфибий городской черты // Экология. 1989. № 3. С. 58–66.

*Вершинин В. Л.* Девиантные формы морфологической изменчивости амфибий как метод исследования микроэволюционных процессов // Экология в высшей школе: синтез науки и образования : материалы Всерос. науч.-практ. конф. 30 марта – 1 апреля 2009 г. Ч. 1. Челябинск: Изд-во Челяб. гос. пед. ун-та, 2009. С. 13–19.

*Вершинин В. Л.* Амфибии и рептилии Урала. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 261 с.

*Мильто К. Д.* К проблеме гигантских головастиков // Вопросы герпетологии : материалы Четвертого съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского. СПб.: Русская коллекция, 2011. С. 178–186.

*Рэфф Р., Коффмен Т.* Эмбрионы, гены и эволюция / пер. с англ. М.: Мир, 1986. 404 с.

*Borkin L. J., Berger L., Gunther R.* Giant tadpoles of water frogs within *Rana esculenta* complex // Zoologia Poloniae. 1984. V. 29, № 1–2 for 1982. P. 103–127.

*Brigitte B.* Temporärer Albinismus bei der Erdkröte (*Bufo bufo*) // Z. Feldherpetol. 1997. V. 4, № 1–2. S. 212–214.

*Cooke A. S.* Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field // Environ Pollut. 1981. V. 25. P. 123–133.

Occurrence of Oral Deformities in Larval Anurans / L. D. Drake, R. Altig, J. B. Grace, S. C. Walls // Copeia. 2007. V. 2. P. 449–458.

*Trubetskaya E. A.* Anomalies of Mouthparts in *Rana arvalis* Nilss Tadpoles and Ecological Conditions Providing for Their Emergence // Russian Journal of Ecology. 2006. V. 37, № 3. P. 193–199.

*Vershinin V. L.* Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // Ecological specificity of amphibian populations. Advances in amphibian research in the former Soviet Union. V. 7. Pensoft Publishers. Moscow – Sophia, 2002a. P. 1–161.

*Vershinin V. L.* Records of Overwintering Larvae of the Siberian Newt (*Salamandrella keyserlingii*) // Ecological specificity of amphibian populations. Advances in amphibian research in the former Soviet Union. V. 7. Pensoft Publishers. Moscow – Sophia, 2002b. P. 195–196.

Xenbase. URL: <http://www.xenbase.org/>

## **Классификация внешних морфологических аномалий бесхвостых амфибий**

Приводимая ниже классификация вариантов внешних морфологических аномалий бесхвостых амфибий основана на работах О. Д. Некрасовой [Некрасова, 2008], J. Rostand [Rostand, 1958], A. Dubois [Dubois, 1979], M. J. Tyler [Tyler, 1989], V. Vershinin [Vershinin, 1995; Vershinin, 2002; Vershinin, 2005]. Отмечены следующие варианты внешних аномалий:

### 1. Осевые аномалии:

#### а) девиации черепа:

- брахицефалия;
- деформация черепа;
- мандибулярная гипоплазия (редукция или отсутствие мандибулы);

#### - монориния;

#### - гидроцефалия;

#### - незакрытая оперкулярная камера (другие ее дефекты);

#### - деформации барабанной перепонки и района височного пятна;

#### б) аномалии глаз:

#### - анофтальмия (отсутствие глаза);

- микрофтальмия (мутация = синдром – редукция составляющих элементов глаза);

#### - необычная пигментация радужины;

#### - депигментация радужины («black eye»);

#### - нарушение закладки хрусталика;

#### - помутнение хрусталика;

#### - аномалии роговицы глаза;

#### - редукция или отсутствие век;

#### - необычное положение глаза [Некрасова, 2008];

#### - аномалии языка [Некрасова, 2008];

#### в) девиации позвоночника:

#### - сколиоз (лордоз, кифоз);

#### - удлинённый (выступающий) или деформированный уростиль;

#### - нерезорбируемый хвост.

### 2. Аномалии конечностей и их поясов:

#### - синдром неподвижных передних конечностей;

#### - синдром неподвижных задних конечностей;

- кожная складка между отделами конечности;
- полимелия (дополнительные конечности);
- брахимелия (симметрично укороченные конечности);
- эктромалия (укороченные или отсутствующие отделы конечности);
- таумелия (сильное нарушение плана строения);
- гемимелия (отсутствие или редукция дистальной части конечности);
- редукция пояса конечности;
- полидактилия;
- клинодактилия = шизодактилия (разветвление пальцев);
- синдактилия (сросшиеся пальцы);
- брахидактилия (симметрично укороченные пальцы);
- эктродактилия (отсутствие части элементов в строении пальцев);
- олигодактилия (меньшее число пальцев).

### 3. Кожные покровы:

- диссипация меланина («крапчатость», фрагментация нормального рисунка);
- необычные цветовые варианты окраски кожи (альбинизм, хромизм, меланизм);
- кожные новообразования (меланомы и пр.).

### 4. Отеки:

- отек дна ротовой полости;
- отек брюшной полости;
- отек конечностей.

### 5. Грыжа (выпячивание органов за стенку тела).

### 6. Отклонения в анатомии внутренних органов:

- сердце (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- легкие (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- желудок (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- печень (отсутствие, аномальная или дополнительная доли печени, атипичные гранулы меланина, жировое прерождение, дистрофия или необычный цвет);
- желчный пузырь (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- почки (непарные, асимметричные);
- гонады (непарные, асимметричные, гермафродитизм и пр.);
- кишечник (спиральный кишечник у взрослых).

## 7. Новообразования, опухоли.

В ряде наших ранних работ данные о встречаемости некоторых аномалий были объединены в один пункт, деформации черепа и позвоночника представлены как деформации осевого скелета, альбинизм и пигментные пятна, как пигментные дефекты, анофтальмия и редукция элементов глаза, как деформации глаза, отек дна ротовой полости и отеки брюшины как отеки (Прим. авт. – В. В.).

## Библиографические ссылки

*Некрасова О. Д.* Классификация аномалий бесхвостых амфибий // Праці Українського герпетологічного товариства. 2008. № 1. С. 55–58.

*Dubois A.* Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana "esculenta"* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. zool. Mus. Berlin. 1979. Pl. 1, № 55. P. 59–87.

*Rostand J.* Les anomalies des amphibiens anoures. Sedes, Paris, 1958. 100 p.

*Tyler M. J.* Australian frogs / Penguin Books Australia Ltd., 1989. P. 163–187.

*Vershinin V. L.* Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // Ecological specificity of amphibian populations. Advances in amphibian research in the former Soviet Union. V. 7. Pensoft Publishers. Moscow-Sophia, 2002. P. 1–161.

*Vershinin V. L.* Morphological deviations in population *Rana arvalis* Nilss. on urbanized territories: spectrum, topography, frequency // N. Ananjeva and O. Tsinenko (eds.). Herpetologica Petropolitana. Proc. of the 12th Ord. Gen. Meeting Soc. Eur. Herpetol., August 12–16, 2003, St. Petersburg, Russ. // J. Herpetol., St. Petersburg – Moscow, 2005. 12 (Suppl.). P. 235–237.

*Vershinin V. L.* Types of Morphological Anomalies of Amphibians in Urban Regions // Amphibian Populations in the Commonwealth of independent States: Current Status and Declines ; eds.: S. L. Kuzmin, C. K. Dodd, Jr., & M. M. Pikulik. Moscow: Pensoft, 1995. P. 91–98.

## Классификация девиантных форм скелета бесхвостых амфибий

Приводимые в данном разделе данные основываются на результатах обобщения проведенных нами исследований морфологии скелетных структур сегментов остромордой, травяной, сибирской и озерной лягушек, из изученных природных популяций; за

основу классификации также взяты варианты аномалий, выделяемые J. Rostand [Rostand, 1958], A. Dubois [Dubois, 1979], M. J. Tyler [Tyler, 1989], Е. Е. Коваленко [Коваленко, 2000], В. Л. Вершинин, Н. С. Неустроева [Вершинин, Неустроева, 2011], Н. С. Неустроева [Неустроева, 2012а; Неустроева, 2012б], Н. С. Неустроева, В. Л. Вершинин [Неустроева, Вершинин, 2011].

Выделены следующие варианты скелетных отклонений:

1. Мандибулярная гипоплазия.
2. Брахицефалия.
3. Разрыв (продольное «расщепление») позвонка (незамкнутая невральная дуга, неслитые половинки тела).
4. Асимметрия позвонка (невральной дуги, тела).
5. Асимметрия поперечных отростков позвонка (по длине, ширине и направлению).
6. Фрагментация поперечных отростков позвонка.
7. Фрагментация позвонка.
8. Слияние позвонков.
9. Отклонения в строении уростиля.
10. Неполное окостенение позвонка.
11. Сколиоз.
12. Нарушение причленения таза к позвоночнику.
13. Полимелия.
14. Брахимелия.
15. Эктромелия.
16. Деформация костей конечностей.
17. Асимметрия пропорций бедра.
18. Асимметрия диаметра костей конечностей.
19. Полидактилия.
20. Клинодактилия.
21. Синдактилия.
22. Эктродактилия.
23. Олигодактилия.
24. Дополнительная фаланга.
25. Искривление фаланги.
26. Выпадение фаланги.
27. Асимметрия толщины фаланг кисти.
28. Асимметрия длины стопы.
29. Утолщение фаланг стопы.

Данные варианты аномалий можно разделить на ряд классов (первые три соответствуют классификации Е. Е. Коваленко [Коваленко, 2000]). I – возникает на основе нарушения сегментации (когда клеточная масса при метаморфозе в сегментах тела головастика распределяется неравномерно): 3 – разрыв позвонка, 4 – асимметрия позвонка, 5 – асимметрия отростков позвонка, 6 – фрагментация поперечных отростков позвонка, 7 – фрагментация позвонка. Отклонение в сегментации личинки лягушки, ведущее к асимметричному расположению миосепт, вызывает асимметричное расположение зачатков позвонков. Такая асимметрия определяется в конечном счете неодинаковой длиной миомеров левой и правой сторон. Она проявляется уже в момент закладки невральных дуг и в свою очередь обуславливает самые различные вариации в строении дефинитивного позвоночника [Коваленко, 1983]. По мнению ряда авторов, асимметрия позвонков – следствие других причин вариаций скелета [Howes, 1893; Adolphi, 1893; Goto, 1906; Sweet, 1908].

II – аномалии, возникающие в результате нарушения размерно-временных отношений в развитии частей эмбриона или личинки: 8 – слияние позвонков, 9 – отклонения в строении уростиля.

III – аномалии, формирующиеся на основе изменения общих темпов развития: 10 – неполное окостенение позвонка, 12 – нарушение причленения таза к позвоночнику.

IV класс – аномалии конечностей и их поясов (в основном относящиеся к периферическим отделам скелета конечностей) встречающиеся у части сеголеток даже в оптимальных условиях развития. Ряд из них описан в работах, посвященных внешним морфологическим отклонениям: эктромелия, брахимелия, эктродактилия, клинодактилия, олигодактилия, утолщение фаланг стопы, асимметрия толщины фаланг кисти, асимметрия диаметра конечностей, искривление фаланг, деформация костей конечностей [Rostand, 1958; Dubois, 1979; Tyler, 1989; Vershinin, 1995; Vershinin, 2002].

## Библиографические ссылки

Вершинин В. Л., Неустроева Н. С. Роль трематодной инвазии в специфике морфогенеза скелета бесхвостых амфибий на примере *Rana arvalis* Nilsson, 1842 // Доклады РАН. 2011. Т. 440, № 2. С. 279–281.



Коваленко Е. Е. Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 117 с.

Коваленко Е. Е. Коррелятивные изменения в позвоночнике травяной лягушки *Rana temporaria* // Зоолог. журн. 1983. Т. 62. Вып. 4. С. 564–569.

Неустроева Н. С. Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2012а. 22 с.

Неустроева Н. С. Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды : дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2012б. 126 с.

Неустроева Н. С., Вершинин В. Л. Скелетные отклонения сеголеток бесхвостых амфибий в условиях урбанизации // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2011. № 4. С. 85–90.

Adolphi H. Uber Variationen der Spinalnerven und der Wirbelsaule anurer Amphibien. I (*Bufo variabilis* Pall.) // Morphol. Jahr. 1893. V. 19, № 3. P. 313–375.

Dubois A. Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana "esculenta"* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. zool. Mus. Berlin. 1979. Pl. 1, № 55. P. 59–87.

Goto S. A few cases of meristic variation in the common toad and isopod // Annot. Zool. Jap. 1906. V. 5. P. 267–276.

Howes G. B. Notes on variation and development of the vertebral and limb skeleton of the Amphibia // Proc. Zool. Soc. London. 1893. V. 19. P. 268–278.

Rostand J. Les anomalies des amphibiens anoures / Societe d'edition d'enseignement superieur. Paris, 1958. 100 p.

Sweet G. Variations in the anatomy of *Hyla aurea* // Proc. Roy. Soc. Victoria. 1908. V. 21. P. 349–364.

Tyler M. J. Australian frogs / Penguin Books Australia Ltd., 1989. P. 163–187.

Vershinin V. L. Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // Ecological specificity of amphibian populations. Advances in amphibian research in the former Soviet Union. Pensoft Publishers. Moscow-Sophia, 2002. V. 7. P. 1–161.

Vershinin V. L. Types of Morphological Anomalies of Amphibians in Urban Regions // Amphibian Populations in the Commonwealth of independent States: Current Status and Declines / Ed. S. L. Kuzmin et al. Moscow: Pensoft, 1995. P. 91–98.

## **Варианты внешних морфологических аномалий хвостатых амфибий**

(на основе работ В. Вершинина [Вершинин, 1989; Вершинин, 1997; Вершинин, 2012; Вершинин, 2014; Vershinin, 1995; Vershinin, 2002], Henle [A review ..., 2012])

### 1. Осевые аномалии:

а) девиации черепа: деформация костей черепа;

б) аномалии глаз:

- анофтальмия (отсутствие глаза);
- микрофтальмия (редукция составляющих элементов глаза);
- необычная пигментация радужины;
- депигментация радужины («black eye»);
- нарушение закладки хрусталика;
- помутнение хрусталика;
- аномалии роговицы глаза;
- редукция или отсутствие век;

в) девиации позвоночника:

- сколиоз (лордоз, кифоз);
- искривление (деформация) хвоста;
- бифуркация хвоста.

Существует также межвидовая и межпопуляционная вариабельность по числу метамерных структур посткраниального осевого скелета [Скоринов, Литвинчук, 2012; Lanza et al., 2010; Litvinchuk, Borkin, 2003].

### 2. Аномалии конечностей и их поясов:

- полимелия (дополнительные конечности);
- брахимелия (симметрично укороченные конечности);
- эктромелия (укороченные или отсутствующие отделы конечности);
- таумелия (сильное нарушение плана строения);
- гемимелия (отсутствие или редукция дистальной части конечности);
- редукция пояса конечности;
- полидактилия;
- клинодактилия = шизодактилия (разветвление пальцев);
- синдактилия (сросшиеся пальцы);

- брахидактилия (симметрично укороченные пальцы);
- эктродактилия (отсутствие части элементов в строении пальцев);
- олигодактилия (меньшее число пальцев).

Детальное описание variability структур конечностей *Salamandrella keyserlingii* содержится в работах [Змеева, 2014; Vorobyeva, Hinchliffe, 1996].

### 3. Кожные покровы:

- необычные цветовые варианты окраски кожи (альбинизм, хромизм, меланизм);
- кожные новообразования (меланомы и пр.).

### 4. Отеки:

- отек дна ротовой полости;
- отек брюшной полости;
- отек конечностей.

### 5. Грыжа (выпячивание органов за стенку тела):

- грыжа легкого;
- грыжа яичника;
- грыжа кишечника.

### 5. Отклонения в анатомии внутренних органов:

- сердце (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- легкие (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- желудок (гипертрофия, недоразвитие и пр.);
- печень (отсутствие, аномальная или дополнительная доли печени);

- желчный пузырь (гипертрофия, недоразвитие и пр.);

- почки (непарные, асимметричные);

- гонады (непарные, асимметричные, гермафродитизм и пр.);

- кишечник.

### 5. Новообразования, опухоли.

## Библиографические ссылки

*Вершинин В. Л.* Морфологические аномалии амфибий городской черты // Экология. 1989. № 3. С. 58–66.

*Вершинин В. Л.* Тераты как «зеркало эволюции» // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды : материалы междунаро-

школы-конф., Екатеринбург, 23–26 сентября 2014 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 45–52.

Вершинин В. Л. Хвостатые земноводные Среднего Урала как индикатор антропогенных преобразований среды // Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования : материалы IV Всерос. науч.-практ. конф. с между нар. участием. Нижний Тагил, 26–29 марта 2012 г. Ч. 1 / отв. ред. Т. В. Жуйкова, О. В. Полявина, О. В. Семенова, О. А. Тимохина; Нижнетагил. гос. соц.-пед. акад. Нижний Тагил: НТГСПА, 2012. С. 81–82.

Вершинин В. Л. Экологические особенности популяций амфибий урбанизированных территорий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Екатеринбург, 1997. 47 с.

Змеева Д. В. О вариантах в строении конечностей в популяциях сибирского углозуба (*Salamandrella keyserlingii* Dybowski, 1870, *Amphibia, Hynobiidae*) // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды : материалы Международ. школы-конф., Екатеринбург, 23–26 сентября 2014 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 112–118.

Скоринов Д. В., Литвинчук С. Н. Изменчивость строения осевого скелета у тритонов рода *Lissotriton*: сравнительно-эволюционные аспекты // Вопросы герпетологии : материалы Пятого съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского, Минск, 25–28 сентября 2012 г. / ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам» ; под ред. Р. В. Новицкого, Н. Б. Ананьевой и др. Минск: Право и экономика, 2013. С. 285–288.

A review of a rare type of anomaly in amphibians, tail duplication and bifurcation, with description of three new cases in European species (*Triturus dobrogicus*, *T. carnifex*, and *Hyla arborea*) / K. Henle, B. Mester, Sz. Lengyel, M. Puky // J. of Herpetology. 2012. V. 46, № 4. P. 451–455.

Lanza B., Arntzen J. W., Gentile E. Vertebral numbers in the Caudata of the western palaeartic (*Amphibia*) // Atti Mus. Civ. Stor. Nat. Trieste. 2010. V. 54. P. 3–114.

Litvinchuk S. N., Borkin L. J. Variation in numbers of trunk vertebrae and of costal grooves in salamanders of the family Hynobiidae // Contr. Zool., Amsterdam. 2003. V. 72, № 4. P. 195–209.

Vershinin V. L. Types of Morphological Anomalies of Amphibians in Urban Regions // Amphibian Populations in the Commonwealth of independent States: Current Status and Declines. Ed. S. L. Kuzmin, C. K. Dodd, Jr., & M. M. Pikulik. Moscow: Pensoft, 1995. P. 91–98.

*Vershinin V. L.* Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*. 2002. V. 7. P. 1–161.

*Vorobyeva E. I., Hinchliffe J. R.* Developmental pattern and morphology of *Salamandrella keyserlingii* limbs (Amphibia, Hynobiidae) including some evolutionary aspects // *Russian Journal of Herpetology*. 1996. V. 3, № 1. P. 68–81.

## **Классификация инфекций и инвазий амфибий**

1. Грибковые поражения кожи (гифы) [Densmore, Earl, 2007].
2. Сапролегниоз [Densmore, Earl, 2007].
2. Хитридиеподобные поражения кожи [Blaustein et al., 1994].
3. Некрозы конечностей [Вершинин, Вершинина, 2013].
4. Ранавирусная инфекция (иридовирусы = «red leg») [Pathological, 1996].
5. Герпесвирус Люка [Lucke, 1934].
6. Бактериальная дерматосептисемия [Densmore, Earl, 2007].
7. Фавобактериоз, хламидиоз (бактериально индуцированные отеки тела или отдельных его частей) [Bacterial diseases, 2001].
8. Микобактериоз [Densmore, Earl, 2007].
9. Изъязвление кожных покровов под действием церкарий (цист) трематод.
10. Скелетные девиации периферического [Session, Ruth, 1990] и осевого посткраниального скелета [Вершинин, Неустроева, 2011], индуцированные церкариями (цистами) трематод.

## **Патологии печени и других органов**

1. Дополнительная доля печени.
2. Замещение одной из долей соединительной тканью.
3. Аномальные жировые включения.
4. Жировое перерождение ткани.
5. Крупные гранулы меланина.
6. Деструкция стромы.
7. Патологии желчного пузыря.
8. Геморроидальное воспаление.

9. Новообразования [Green, Harshbarger, 2001; The Registry of Tumors...].

10. Различие парных органов (легких, гонад, почек) по форме, размеру и цвету.

### Библиографические ссылки

*Вершинин В. Л., Вершинина С. Д.* Влияние локальных изменений климата на земноводных как отражение глобальных процессов // Праці Українського Герпетологічного Товариства. Київ, 2013. № 4. С. 42–48.

*Вершинин В. Л., Неустроева Н. С.* Роль трематодной инвазии в специфике морфогенеза скелета бесхвостых амфибий на примере *Rana arvalis* Nilsson, 1842 // Доклады РАН. 2011. Т. 440, № 2. С. 279–281.

Bacterial diseases / Amphibian Medicine and Captive Husbandry / S. K. Taylor, D. E. Green, K. M. Wright, B. R. Whitaker ; eds. K. M. Wright, B. R. Whitaker, F. L. Malabar: Krieger Publishing Company, 2001. P. 159–179.

*Blaustein A. R., Hokit D. G., O'Hara R. K.* Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest // Biol Cons. 1994. V. 67. P. 251–254.

*Densmore C. L., Earl D.* Green Diseases of Amphibians // ILAR Journal. 2007. V. 48, № 3. P. 235–254.

*Green D. E., Harshbarger J. C.* Spontaneous neoplasia in amphibia // Amphibian Medicine and Captive Husbandry ; eds. K. M. Wright, B. R. Whitaker, F. L. Malabar: Krieger Publishing Company, 2001. P. 335–400.

*Lucke B.* A neoplastic disease of the kidney of the frog, *Rana pipiens* // Am. J. Cancer. 1934. V. 20. P. 352–379.

Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*) / A. A. Cunningham, T. E. S. Langton, P. M. Bennett, J. F. Lewin, S. E. N. Drury, R. E. Gough, S. K. Macgregor // Philo Trans Biol Sci. 1996. V. 351. P. 1539–1557.

*Sessions S. K., Ruth S. B.* Explanation for naturally occurring supernumerary limbs in amphibians // J. of Exp. Zool. 1990. V. 254. P. 38–47.

The Registry of Tumors in Lower Animals. URL: <http://www.pathology-registry.org>.

## МЕТОДИКИ ПРОСВЕТЛЕНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Детальное исследование девиантных форм скелетных структур невозможно без процедуры просветления мягких тканей и окраски костных, а нередко и хрящевых элементов. Рентгеновский анализ и очистка скелета не дают возможности работы с тонкими скелетными и хрящевыми структурами.

### Метод Даусона

Метод исходно был разработан для изучения скелета эмбрионов млекопитающих [Dawson, 1926].

Готовится раствор А – 1 %-й водный раствор красного ализарина. Раствор Б – глицерина 200 мл, воды дистиллированной 800 мл, едкой щелочи (КОН) – 10 г. Раствор В – 1 %-й водный раствор КОН. Плоды 20-го дня развития фиксируют в 96 %-м этиловом спирте 7–10 дней и затем переносят в водный раствор КОН (раствор В). Плоды держат в этом растворе до тех пор, пока не становятся видны закладки костей (1–2 суток). Затем плоды промывают водопроводной водой, добавляют несколько капель раствора А в раствор Б до появления светло-фиолетового цвета. В эту жидкость помещают плоды и держат до тех пор, пока участки костей будут хорошо окрашены в красно-фиолетовый цвет (не менее 3–5 суток).

Для обесцвечивания и окончательного просветления мягких тканей переносят плоды на 7–12 дней в чистый раствор Б. Затем производят обезвоживание плодов путем медленной проводки через смеси спирта, глицерина и воды в пропорциях 1:2:7, 2:2:6, 4:4:2, равные части спирта и глицерина. Плоды хранят в чистом глицерине, в который добавляется 1–2 капли 40 %-го формалина, чтобы предупредить загнивание.

Приготовленные препараты по завершении процессов просветления и окраски готовы для хранения и просмотра под бинокулярным микроскопом на предмет выявления скелетных аномалий.

## Библиографические ссылки

*Dawson A. B.* A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. // *Stain. Technology.* 1926. V. 1. P. 123–125.

## Приготовление и применение бинарного красителя

Для исследований аномалий костных и хрящевых элементов скелета применяется методика с использованием бинарного красителя [Dingerkus, Uhler, 1977; Walker, Kimmel, 2007]. Приготовление красителя происходит в следующей последовательности: раствор для окрашивания состоит из двух частей, которые смешиваются непосредственно перед применением. Часть А включает альциан синий для окрашивания хрящевой ткани, и часть Б, включающая ализарин красный для окраски костной ткани. Конечная концентрация части А – 0,02 %-й альциан синий, 0–200 мМ хлорида магния ( $MgCl_2$ ) и 70 %-й этанол. Поскольку альциан синий плохо растворяется в 70 %-м этаноле, порошкообразный альциан добавляют к небольшому объему 50 %-го этанола, выдерживают при 37 °С и перемешивают до полного растворения; 95 %-й этанол и вода добавляются позже до получения конечной концентрации. 100 мл части А получают при смешивании 5 мл 0,4 %-го альциана синего в 70 %-м этаноле, 70 мл 95 %-го этанола, хлорида магния и воды до получения конечной концентрации. Часть Б представляет собой 0,5 %-й ализарин красный растворенный в воде. Части А и Б могут храниться при комнатной температуре от нескольких месяцев до года. Раствор для двойного окрашивания представляет собой 10 мл части Б и 1 мл части А, которые смешиваются непосредственно перед окрашиванием.

Если материал из формалина на 10 минут поместить в 50 %-й спирт. Окраска за 12 часов при температуре 26 °С.

После окраски производится отмывание смесью 1х1 из 2 %-го раствора гидроксида калия водного (2 г на 100 мл воды) и 3 %-й перекиси водорода (можно купить в аптеке). Отмывка около 10 минут, после чего выполняется просветление раствором КОН.

Проводка по глицерину: 1-й этап – 12 %-й глицерин и вода, каждый день повышать концентрацию на 12 % (12 – 25 – 37 – 50 % и т. д.).



## Библиографические ссылки

*Dingerkus G., Uhler L. D.* Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage // *Stain Technol.* 1977. V. 52. P. 229–232.

*Walker M., Kimmel C.* A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae // *Biotechnic and Histochemistry.* 2007. V. 82, № 1. P. 23–28.

## Методика изготовления и применения бинарного красителя

(Dingerkus, Uhler, 1977; Walker, Kimmel, 2007 в модификации Е. Е. Коваленко [Коваленко, 2000] и Ю. И. Кружковой [Кружкова, 2008])

1. Предварительная промывка фиксированного коллекционного материала в водопроводной воде – 1 сутки.

2. Обесцвечивание пигментных клеток в 4 %-м  $H_2O_2$  ~ 2 часа

Продолжительность пребывания объекта в перекиси устанавливается экспериментально. Как только пигмент исчезнет – сразу извлечь. Передерживать нельзя, так как  $H_2O_2$  декальцинирует кость, и она в дальнейшем плохо прокрашивается.

3. Промывка.

Желательно проводить ее в проточной воде (или при частой смене) – 1 сутки.

4. Окраска хряща – 1–2 суток.

В процессе объект можно вынимать и контролировать степень прокрашивания. Передерживать не стоит, так как излишек красителя оседает в мягких тканях.

Приготовление красителя:

– 20 мг альциана;

– 60 мл 100 %-го этанола;

– 40 мл ледяной уксусной кислоты.

Все ингредиенты соединить и помешивать до полного растворения альциана.

5. 100 %-й этиловый или изобутиловый, или бутиловый спирт – 1 сутки (при необходимости можно оставить на несколько суток).

6. Окраска кости – 1 сутки.

Краситель: 2 %-й КОН + ализариновый красный.

- 20 г кристаллического КОН растворить в 1 л дистиллированной воды.

- Если вам предстоит окраска массового материала, то раствор ализарина можно сделать про запас и хранить в концентрированном виде.

В небольшое количество дистиллированной воды добавлять порошок ализарина (постоянно помешивая) до тех пор, пока раствор не станет коричневым.

- В необходимое количество раствора КОН добавить концентрированный раствор ализарина. Полученный краситель должен быть интенсивного малинового цвета.

7. Просветление мягких тканей:

а) 2 %-й КОН + глицерин (1:1) – 1 сутки.

б) 2 %-й КОН + глицерин (1:3) – 1 сутки.

Если ткани плохо просветлились можно оставить объект в растворе на более длительный срок.

с) 100 %-й глицерин – на всю оставшуюся жизнь препарата.

## Библиографические ссылки

*Коваленко Е. Е.* Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 117 с.

*Кружкова Ю. И.* Строение, развитие и изменчивость крестцово-тазового комплекса бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) : автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2008. 24 с.

*Dingerkus G., Uhler L. D.* Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage // *Stain Technol.* 1977. V. 52. P. 229–232.

*Walker M., Kimmel C.* A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae // *Biotechnic and Histochemistry.* 2007. V. 82, № 1. P. 23–28.

## Протокол по просветлению и окраске хрящевых и костных структур для исследования

(модифицированный по Hanken и Wasserug, 1981)

В результате применения метода хрящи окрашиваются в синий, а костная ткань в красный цвет при прозрачных мягких тканях.

1. Зафиксировать образец в 10 %-м забуференном растворе формалина (по меньшей мере на 24 часа).

2. Промывание в течение 1 часа (для эмбрионов) и 1 день (для взрослых) с несколькими сменами воды.

3. Последующая фиксация в 70 %-м этаноле (может храниться неопределенно долго).

4. Удалить всю кожу с образца, даже на кончиках пальцев (очистка не нужна для эмбрионов, головастики лягушек и свежеметаморфизировавших сеголеток).

5. Поместить образец в раствор ализана синего для окраски хрящевой ткани (20 мг ализана синего в этаноле/уксусной кислоте = растворенных в 70 мл 100 %-го этанола: 30 мл ледяной уксусной кислоты) на один день.

6. Переместить плавно (в течение 1 часа) в этанол/уксусную кислоту (1 час) и затем в 100 %-й этанол (на 24 часа).

7. Поместить образец в воду для отмывания (на ночь).

8. Перевод в 1,0 %-й трипсин в 30 %-м насыщенном борате натрия. Проверить по проставке одного дня и, если будет ясно виден мягкий и синий хрящ, перейти к следующему этапу. В противном случае повторить вновь со свежим трипсином. Не следует затягивать данный этап слишком надолго, иначе кончики пальцев начнут растворяться!

9. Перевести в 0,5 %-м КОН, достаточно насытив его ализарином красным-S до окраски раствора в темно-фиолетовый цвет (добавляя насыщенный водный раствор ализарина красного из стакана) ... один день.

10. Перевести плавно 0,5 %-й КОН, для отмывания после ализарина красного ... единожды или дважды в течение 24-часового периода.

11. Проводка по градиентному ряду 0,5 %-й КОН: глицерин: 2:1, затем 1:1, затем 1:2, затем 100 %-й глицерин, несколько дней

по одной неделе для каждого шага, пока образец не становится кристально прозрачным. Хранить образец в 100 %-м глицерине с добавлением одного кристаллика тимола в емкости с завинчивающейся крышкой.

Предупреждение: тщательно проверяйте кожу на наличие цист.

### **Библиографические ссылки**

*Hanken J., Wasserug R. J.* The visible skeleton // *Funct. Photog.* 1981. V. 16. P. 22–26.

## СХЕМА РАСЧЕТНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕННЫХ ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ

### Простые показатели

Установление числа вариантов отклонений при просмотре выборки на основании принятой классификации аномалий. Число вариантов – это количество разных аномалий (разных вариантов), отмеченных в обследованной выборке (общий спектр аномалий –  $S_{ap}$  по Боркин и др., 2012).

Расчет частоты аномальных особей – процент животных с аномалиями в изученной выборке ( $P_{as}$  по Боркин и др., 2012).

Частота аномалии (определенного варианта) – процент числа одного из вариантов аномалий от общего количества животных в выборке.

Доля сочетанных аномалий – это отношение числа особей, несущих несколько аномалий одновременно, к общему числу аномалий в выборке (в процентах).

Вероятность появления сочетанных аномалий редка относительно частот простых аномалий и является произведением вероятностей (частот) каждой из этих аномалий [Dubois, 1979].

Число аномалий на 1 особь – простое частное от деления суммарного числа всех отмеченных в выборке аномалий на общее число особей в той же выборке.

Представление первичных данных о вариантах и их встречаемости в виде спектра. В спектрах отражена встречаемость (частота в процентах или долях) различных вариантов аномалий на объем исследуемой выборки животных. Оценка значимости различий встречаемости аномалий определяется с помощью стандартного критерия –  $\chi^2$ .

Следует также обращать внимание на топографическое позиционирование аномалий на теле, где больше отклонений – на передних или на задних конечностях; в осевой или периферической частях скелета, какие элементы чаще аномальны; что преобладает – олиго- или полимеризация элементов (фаланг, пальцев и пр.).

## Расчетные показатели

Степень перекрыwania двух спектров рассчитывается с помощью модифицированного индекса Мориситы [Hurlbert, 1978]:

$$C_M = 2 \times \sum x_i \times y_i / \sum x_i^2 + \sum y_i^2,$$

где  $x_i$   $y_i$  – часть  $i$ -го варианта аномалий в спектре двух видов  $x$  и  $y$ . Коэффициент перекрыwania  $C_M$  изменяется в пределах от 0 – когда спектры совершенно различны, до 1 – когда они идентичны. Под знаком суммы  $\Sigma$  лежит равенство  $\Sigma x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_s$  ( $s$  – число аномалий, входящих в спектр). Требуется вычислить три такие суммы –  $x_i$  в квадрате,  $y_i$  в квадрате и сумму произведений  $x_i y_i$ .

Индекс Чекановского – Серенсена для качественных признаков не учитывает их частот, а модифицированный с учетом частот полностью совпадает с приводимой выше формулой Мориситы:

$$C_N = \frac{2 \times (\sum n_{ix} \times n_{iy})}{\sum (n_{ix}^2 + n_{iy}^2)},$$

где

$n_{ix}$  – доля  $i$ -го компонента в спектре аномалий выборки  $x$ ;

$n_{iy}$  – доля  $i$ -го компонента в спектре аномалий выборки  $y$ .

Кластерный анализ позволяет определить дистанционированность получаемых спектров девиантных форм.

Стандартные индексы, используемые для количественной меры биоразнообразия, хорошо применимы для оценок разнообразия аномалий.

Все эти индексы сильно коррелируют между собой, то есть оценивают примерно одно и то же. Разумеется, все они имеют ряд ограничений и несовершенны. По этой причине желательно использовать сразу несколько таких индексов, чтобы как-то нивелировать эти недостатки. Существует программа «PAST», в которой можно легко рассчитать эти несколько индексов, оценивающих разнообразие, степень выровненности, доминирование и затем провести сравнение дистанционированности выборок на основе сово-

купности ряда перечисленных параметров биоразнообразия с помощью кластерного анализа.

## **Интерпретация результатов**

Использование результатов исследований аномалий лежит как в плоскости теоретических интерпретаций, так и в практическом их применении – возможностях оценки здоровья среды и экстраполяции данных для понимания отдаленных последствий этих изменений для человека.

Эволюционная значимость подобных работ состоит в применении результатов в обсуждении проблем морфологической эволюции – при решении вопросов о происхождении тех или иных органов, систем, конкретных таксонов.

С наиболее общих позиций важную роль играет понимание принципов и механизмов возникновения эволюционных инноваций, закономерностей и направлений эволюционного процесса, а также соотношения и взаимосвязи между молекулярной и морфологической эволюцией, ролью регуляторных механизмов и экологической компоненты в этих процессах.

Анализ и обобщение информации необходимо проводить на разных иерархических уровнях организации (генетическом – изменения в основной, ключевой последовательности, изменения в экспрессии генов; клеточном уровне – физиология, особенности пролиферации и пр.; специфика процессов тканевой дифференцировки, органо- и морфогенеза, формирование морфофункциональной специфики различных систем организма в ходе онтогенеза; основы формирования популяционной специфики на генетическом, физиологическом, морфофункциональном уровнях; видовые и таксономические параллелизмы и специфика, биоэкологическое значение и роль в коэволюционных системах).

Важным моментом в интерпретации и осмыслении получаемых сведений является как составление профилей девиаций для конкретных популяций, видов, таксономических категорий более высоких рангов [Коваленко, 2000], так и географическое картирование [Lokalized Hotspots ..., 2013; Amphibian Malformations... ] распределения аномалий и их частот в естественных и антропогенных градиентах среды в пределах ареалов.

Для территории большинства государств этот процесс находится в начальной стадии [Ouellet, 2000; Замалетдинов, 2014; Микитинец, 2014].

## Библиографические ссылки

*Боркин Л. Я., Безман-Мосейко О. С., Литвинчук С. Н.* Оценка встречаемости аномалий в природных популяциях (на примере амфибий) // Труды Зоолог. ин-та Рос. академии наук. Санкт-Петербург. 2012. Т. 316, № 4. С. 324–343.

*Замалетдинов Р. И.* Материалы по встречаемости морфологических аномалий в природных популяциях бесхвостых амфибий на территории Республики Татарстан // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды : материалы Международ. школы-конф., Екатеринбург, 23–26 сентября 2014 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 105–111.

*Коваленко Е. Е.* Изменчивость посткраниального скелета бесхвостых амфибий (Amphibia, Anura) : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000. 117 с.

*Микитинец Г. И.* География встречаемости морфологических аномалий в популяциях бесхвостых амфибий степной зоны Украины // Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение, возможность оценки здоровья среды : материалы Международ. школы-конф. Екатеринбург, 23–26 сентября 2014 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 136–144.

Amphibian Malformations. URL: [www.npwrc.usgs.gov/narcam](http://www.npwrc.usgs.gov/narcam).

*Dubois A.* Anomalies and mutations in natural populations of the *Rana "esculenta"* complex (Amphibia, Anura) // Mitt. zool. Mus. Berlin. 1979. Pl. 1, № 55. P. 59–87.

*Hurlbert S. H.* The measurement of niche overlap and some relatives // Ecology. 1978. V. 59, № 1. P. 67–77.

Localized Hotspots Drive Continental Geography of Abnormal Amphibians on U.S. Wildlife Refuges / M. K. Reeves, K. A. Medley, A. E. Pinkney, M. Holyoak, P. T. J. Johnson, M. J. Lannoo // PLOS ONE. November, 2013. V. 8, Is. 11. e77467. P. 1–14.

*Ouellet M.* Amphibian deformities: current state of knowledge // Ecotoxicology of Amphibian and Reptiles. Chapter 11. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola F. L. 2000. P. 617–681.



## БИОИНДИКАЦИОННОЕ ЗНАЧЕНИЕ АНОМАЛИЙ

Несмотря на то, что многие авторы указывают на амфибий как потенциальные объекты биоиндикации [Плисс, Худолей, 1979; Cooke, 1981; Tyler, 1983; Vershinin, 2002; Балахонов, 1990], не существует единой, достаточно хорошо разработанной методологии использования аномалий для оценки качества среды. Причина – в наличии межвидовых различий, адаптивных изменений в популяциях [Vershinin, Kamkina, 2001], географических, геохимических и ряда других особенностей. Нередко наличие девиантных форм в популяциях амфибий пытаются использовать в целях биоиндикации механистически, тогда как феномены массовых аномалий известны и для популяций из экологически благополучных регионов [Войткевич, 1965; Rostand, 1958].

Сложность трактовки наблюдаемых явлений и отсутствие единой развитой методологии являются причиной представлений о том, что нельзя однозначно считать амфибий более эффективными, чем другие таксоны, для оценки состояния биоразнообразия или качества среды обитания [Beebe, Griffiths, 2005]. Тем не менее, несмотря на различные точки зрения, природные популяции амфибий представляют собой чувствительные индикаторы комплексного изменения среды, оказывающего влияние на репродуктивную систему, выживаемость, стабильность развития, генетическую структуру, их экосистемные и коэволюционные связи.

Сходства и различия в спектрах девиантных форм у близких видов и таксонов, а также их частоте и степени выраженности (пенетрантности и экспрессивности в случае мутаций) могут характеризовать норму реакции, вариабельность формообразовательной потенции, а также степень толерантности морфогенеза к дестабилизации среды. Характер ответа морфогенетической системы вида на популяционном уровне может определить его судьбу [Вершинин, 2007] при динамичных (антропогенных) флуктуациях среды и в условиях глобальных

изменений [Pounds, 2001]. В то же время анализ дистанционности полных спектров отклонений дает возможность выявить различия в норме реакции видов и, кроме прочих причин, зависит от их филогенетических и ценогенетических особенностей [Vorobyeva, Hinchliffe, 1996; Вершинин, 2008].

В преддверии биосферных кризисов незадолго до вымирания группы палеонтологами отмечается большое количество уклоняющихся (девиантных) форм. Это означает, что мы имеем дело с раскрепощением скрытой изменчивости в связи с вхождением группы в некогерентную фазу эволюции [Красилов, 1986]. В условиях кризиса конкурентоспособность не имеет решающего значения. Поэтому возможно существование своего рода экспериментальных форм – «небезнадежных уродов» (perspective monsters) [Goldschmidt, 1982], которые в нормальных условиях отмирают стабилизирующим отбором.

Показано, что выпадение ряда факторов естественной смертности и отбор особей по наследственно обусловленным особенностям нервной системы может приводить к выходу в фенотип новых признаков, выходящих за рамки обычного спектра морфологической изменчивости [Беляев, 1974; Беляев, 1979]. Это, на наш взгляд, является одной из причин роста доли девиантных форм в популяциях, обитающих на урбанизированных территориях [Vershinin, 2005], а также свидетельствует о сходстве процессов урбанизации и доместикации. Чтобы оценить роль подобных форм в эволюции, необходимы данные специальных исследований [Попов, 1999].

Пределы формообразовательной потенции каждого из видов определяются его генетической спецификой и составляют норму реакции, которой и определяется потенциальный спектр изменчивости. В то время как реализованный спектр изменчивости определяется экологической составляющей процесса онтогенеза, которая его канализирует и формирует дефинитивный спектр. Наблюдаемые у изучаемых видов различия – результат реализации формообразовательного потенциала в динамичных условиях среды. Итог зависит от экологической пластичности, толерантности, а также уровня выживаемости потомства на разных этапах жизненного цикла (эмбрионального, личиночного развития,

прохождения метаморфоза) до момента завершения метаморфоза, специфики ценогенетических адаптаций и регуляторики.

Известно, что канализация процесса морфогенеза в условиях антропогенной дестабилизации среды – результат сочетания формообразовательной потенции вида, адаптивного потенциала и варианта репродуктивной стратегии, реализуемой в условиях дестабилизации среды. Различия дефинитивных спектров девиаций во многом связаны со спецификой воспроизводства, выживаемостью потомства и результатом прохождения потенциального спектра аномалий через «экологическое сито» определенной среды.

Встречаемость «фенодевиантов» в градиенте антропогенного ландшафта может быть использована при оценке адаптивных изменений аналогично слежению за приспособленностью популяции во времени по изменчивости полигенных признаков [Алтухов, 2003]. Анализ спектров аномалий популяций, населяющих фоновые и загрязненные территории по качественным и количественным параметрам (сочетания спектра девиантных форм и их частот) показал, что этот подход наиболее информативен и хорошо отражает градиент антропогенной трансформации среды [Неустроева, Вершинин, 2011; Неустроева, 2012а, Неустроева, 2012б; Verшинin, 2005]. Кроме того, аномалии могут служить маркерами таких негативных изменений, как инбридинговая депрессия, а также нарушений в коэволюционной системе паразит-хозяин [Вершинин, Неустроева, 2011; Вершинин, 2014].

## **Биоиндикационные параметры**

1. Аномалии и патологии внутренних органов значимые для нормального функционирования организма (печень, сердце, почки, гонады) и видимые без применения специальных гистологических методов (см. разделы «Классификация внешних морфологических аномалий бесхвостых амфибий» и «Патологии печени»).

2. Патологии гамет как индикатор физиологического состояния производителей.

3. Доля интерсексов и гермафродитизм как показатель присутствия в среде эндокринных дизрапторов [Skelly et al., 2010; Storrs-Mendez, Semlitsch, 2010].

4. Наличие и частота аномальных и патологических кладок как сигнальная информация о физиологическом состоянии самок.
5. Аномалии эмбрионов – спектр и частота, а также наличие редких леталей, эмбриотоксический (эмбриостатический) эффект поллютантов.
6. Высокий уровень асинхронности развития эмбрионов в кладке.
7. Аномалии личинок – доля, спектр, летальность (сублетальность).
8. Соотношение спектров аномалий: потенциального, фонового и реализованного.
9. Накопление аномальных регенератов и пр. в популяциях хвостатых и сравнение спектров девиантных форм.
10. Генетические отклонения – внешнее проявление как показатель инбридинга, дрейфа генов, фенотипические маркеры наследственной отягощенности.
11. Состояние паразитоценозов как индикаторов синергетических воздействий антропогенной трансформации среды на равновесное состояние коадаптивных, коэволюционных систем.

### **Библиографические ссылки**

- Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях / отв. ред. Л. А. Животовский. М.: ИКЦ «Академкнига», 2003. 431 с.
- Балахонов А. В.* Ошибки развития. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1990. 280 с.
- Беляев Д. К.* Дестабилизирующий отбор как фактор изменчивости при domestикации животных // *Природа*. 1979. № 2. С. 36–45.
- Беляев Д. К.* О некоторых моментах стабилизирующего и дестабилизирующего отбора // *История и теория эволюционного учения*. Л., 1974. Вып. 2. С. 76–84.
- Вершинин В. Л.* Амфибии как индикаторы состояния экосистем // *Урбоэкосистемы: проблемы и перспективы развития : материалы III Междунар. науч.-практ. конф.* Ишим : Изд-во ИГПИ им. Ершова, 2008. С. 171–173.
- Вершинин В. Л.* Тераты как «зеркало эволюции» // *Аномалии и патологии амфибий и рептилий: методология, эволюционное значение,*

возможность оценки здоровья среды : материалы Международ. школы-конф., Екатеринбург, 23–26 сентября 2014 г. / под общ. ред. В. Л. Вершинина, А. Дюбуа, К. Хенле, М. Пуки. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. С. 45–52.

*Вершинин В. Л.* Морфологические девиации в популяциях травяной лягушки (*Rana temporaria* Linnaeus, 1758) на урбанизированных территориях: спектр и частота // Биоразнообразие и роль животных в экосистемах : материалы Междунар. науч. конф. Днепропетровск, 2007. С. 360–361.

*Вершинин В. Л., Неустроева Н. С.* Роль трематодной инвазии в специфике морфогенеза скелета бесхвостых амфибий на примере *Rana arvalis* Nilsson, 1842 // Доклады РАН. 2011. Т. 440, № 2. С. 279–281.

*Войткевич А. А.* Массовое образование дополнительных задних конечностей у озерной лягушки // Журнал общ. биологии. 1965. Т. 26, № 1. С. 56–62.

*Красилов В. А.* Нерешенные проблемы эволюционного учения / Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. 140 с.

*Неустроева Н. С.* Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2012а. 22 с.

*Неустроева Н. С.* Морфологическая изменчивость скелета представителей рода *Rana* в условиях антропогенной дестабилизации среды : дисс. ... канд. биол. наук. Казань, 2012б. 126 с.

*Неустроева Н. С., Вершинин В. Л.* Скелетные отклонения сеголеток бесхвостых амфибий в условиях урбанизации // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2011. № 4. С. 85–90.

*Плисс Г. Б., Худoley В. В.* Онкогенез и канцерогенные факторы у низших позвоночных и беспозвоночных животных // Эколог. прогнозирование. М., 1979. С. 167–185.

*Попов И. Ю.* Монстры в эволюции. Эволюционная биология: история и теория. СПб.: СПбФИИЕТ РАН, 1999. С. 70–81.

*Beebe T. J. C., Griffiths R. A.* The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? // Biological Conservation. 2005. V. 125. P. 271–285.

*Cooke A. S.* Tadpoles as indicators of harmful levels of pollution in the field // Environ. Pollut. Ser. A. 1981. V. 25. P. 123–133.

*Goldschmidt R.* The material basis of evolution. New Haven : Yale Univ. Press, 1982. XLIII. 436 p.

*Pounds J. A.* Climate and amphibian declines // Nature (Gr. Brit.). 2001. V. 410, № 6829. P. 639–640.

*Rostand J.* Les anomalies des amphibiens anoures. Sedes, Paris, 1958. 100 p.

*Skelly D. K., Susan R. Bolden & Kirstin B. Dion.* Intersex Frogs Concentrated in Suburban and Urban Landscapes // *EcoHealth*. 2010. V. 7.I.3. P. 374–379.

*Storrs-Mendez S. I., Semlitsch R. D.* Intersex Gonads in Frogs: Understanding the Time Course of Natural Development and Role of Endocrine Disruptors // *J. of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution*. 2010. 314B. P. 57–66.

*Tyler M. J.* Natural pollution monitors // *Aust. Nat. Hist.* 1983. V. 21. P. 31–33.

*Vershinin V. L.* Ecological specificity and microevolution in amphibian populations in urbanized areas // *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*. 2002. V. 7. P. 1–161.

*Vershinin V. L.* Morphological deviations in population *Rana arvalis* Nilss. on urbanized territories: spectrum, topography, frequency // N. Ananjeva and O. Tsinenko (eds.). *Herpetologica Petropolitana. Proc. of the 12th Ord. Gen. Meeting Soc. Eur. Herpetol.*, August 12–16, 2003, St. Petersburg, Russ. // *J. Herpetol.*, St. Petersburg – Moscow, 2005. 12 (Suppl.). P. 235–237.

*Vershinin V. L., Kamkina I. N.* Proliferative activity of corneal epithelium and specific features of morphogenesis in postmetamorphic *Rana arvalis* Nilss. in urbanized areas // *Russian Journal of Ecology*. 2001. V. 32, № 4. P. 272–276.

*Vorobyeva E. I., Hinchliffe J. R.* Developmental pattern and morphology of *Salamandrella keyserlingii* limbs (Amphibia, Hynobiidae) including some evolutionary aspects // *Russian Journal of Herpetology*. 1996. V. 3, № 1. P. 68–81.

## ОБЩАЯ СХЕМА АНАЛИЗА ДЕВИАНТНЫХ ФОРМ ЧАСТЕЙ ТЕЛА И ОРГАНОВ

Экстерьерные аномалии (выявляемые при внешнем осмотре частей тела и органов)														
Анатомические отклонения														
Эпителиальные (кожные покровы)														
Мышечные														
Внутренние органы	Сердце													
	Легкие													
	Желудок													
	Лечень													
	Желчный пузырь													
	Почки													
	Гонады													
	Кишечник													
	Рострум													
	Челюсти													
	Язык													
	Ноздри													
	Веки													
	Глаза	Роговица												
Радушка														
Хрусталик														
Голова	Бараньи перепонки													
	Пояс передних конечностей													
	Пояс задних конечностей													
	Дорзальная конечность													
	Вентральная конечность													
Тело	Хвостовая													
	Вентральная													
	Дорзальная													
	Передние конечности													
	Задние конечности													
Передние конечности	Пальцы													
	Кисти													
	Предплечье													
	Бедро													
	Голень													
Задние конечности	Пальцы													
	Стопы													
	Голень													
	Бедро													
	Хвост													
Хвост	Пальцы													
	Стопы													
	Голень													
	Бедро													
	Хвост													
Хвост	Передние конечности													
	Задние конечности													
	Конечности													
	Вентральная													
	Хвост													

Учебное издание

**Вершинин Владимир Леонидович**

**ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ  
И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ  
АНОМАЛИЙ И ПАТОЛОГИЙ  
АМФИБИЙ**

Учебное пособие

Ответственная за выпуск *Д. Д. Шакирзянова*

Редактор и корректор *Е. Е. Крамаревская*

Компьютерная верстка *А. Ю. Матвеев*



Подписано в печать 30.01.2015. Формат 60x84 1/16  
Бумага офсетная. Гарнитура Times  
Уч.-изд. л. 4,2. Усл. печ. л. 4,5.  
Тираж 300 экз. Заказ 89.

Издательство Уральского университета  
620000, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4

Отпечатано в Издательско-полиграфическом центре УрФУ  
620000, Екатеринбург, ул. Тургенева, 4  
Тел.: +7 (343) 350-56-64, 350-90-13  
Факс: +7 (343) 358-93-06  
E-mail: [press-urfu@mail.ru](mailto:press-urfu@mail.ru)