

УДК 597.851:591.147.8

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРИНАЛЬНОЙ СПЕРМЫ ТРЕХ ВИДОВ ПАЛЕАРКТИЧЕСКИХ БУРЫХ ЛЯГУШЕК

© В.К. Утешев, А.А. Кидов, С.А. Каурова,
Н.В. Шишова, Е.В. Мельникова, А.В. Ковалев

Ключевые слова: земноводные; бурые лягушки; уринальная сперма; сперматозоиды; криоконсервация. Изучение характеристик уринальной спермы амфибий является актуальной задачей в связи с возросшим интересом к проблемам криоконсервации геномов животных и, в частности, к проблемам криобанкирования уринальной спермы земноводных. В данном исследовании проведен сравнительный анализ показателей уринальной спермы трех видов палеарктических бурых лягушек: травяной *Rana temporaria*, остромордой *R. arvalis* и гирканской *R. macrocnemis pseudodalmatina*. Показано, что по таким характеристикам, как концентрация сперматозоидов в уринальной сперме, общее количество сперматозоидов в образцах спермы и длительность жизни сперматозоидов, травяная лягушка достоверно отличается от лягушек остромордой и гирканской. Поскольку успешность криоконсервации уринальной спермы амфибий зависит от ее вышеперечисленных показателей, данное исследование будет полезным при создании методов криоконсервации уринальной спермы палеарктических бурых лягушек.

ВВЕДЕНИЕ

Значительное повсеместное снижение видового разнообразия земноводных требует принятия эффективных мер охраны видов, находящихся под угрозой исчезновения. В настоящее время для обеспечения эффективной защиты биологического разнообразия амфибий необходимо создавать целый комплекс природоохранных мероприятий. Составной частью комплекса мер охраны являются работы по разведению угрожаемых видов «ex situ» в питомниках, зоопарках или в специализированных лабораториях, а также создание криоколлекций и криобанков, в которых длительное время могут храниться репродуктивные клетки с полноценным геномом.

В последние десятилетия наблюдается большой интерес к технологии генетического криобанкирования биоматериала земноводных [1, 7, 9, 13]. К настоящему времени реальным генетическим материалом амфибий, поддающимся криоконсервации, является тестикулярная [2–3, 8, 10–11] или уринальная сперма [12, 14]. Икру или ранние зародыши земноводных криоконсервировать пока не удается. При этом в программах по сохранению редких и исчезающих видов уринальная сперма, получаемая прижизненно от гормонально стимулированных самцов, имеет несомненное преимущество перед тестикулярной спермой, для получения которой необходимо умерщвлять животных. Успешность криоконсервации уринальной спермы амфибий зависит от различных ее показателей. Поэтому исследования характеристик уринальной спермы не изученных в этом отношении видов являются вполне актуальными.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ уринальной спермы самцов трех видов палеарктических бурых лягушек: травяной *Rana temporaria* Linnaeus, 1758; остромордой *R. arvalis* Nilsson, 1842 и гирканской *R. macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidtler, 1971.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Самцы и самки травяной и остромордой лягушек были собраны в период размножения в нерестовом водоеме в окрестностях города Пушкино Московской области. Гирканские лягушки были отловлены в проточных прудах селения Сым Астаринского района Азербайджанской Республики в конце зимовки (1 декада января 2012 г.).

Животные, разделенные по полу, были помещены в пластиковые контейнеры с небольшим количеством воды. До использования в экспериментах лягушек содержали в зимовальном помещении лаборатории криоконсервации генетических ресурсов ИБК РАН при круглосуточной температуре +6 °С.

Для получения уринальной спермы самцам инъецировали сурфагон (синтетический аналог гипоталамического гормона люлиберина) в дозе 1,2 мкг/грамм массы тела в объеме 0,2 мл физиологического раствора. Уринальную сперму получали путем мягкого массажа брюшной области. Вытекающую из клоаки уринальную сперму собирали в чашки Петри. Сбор образцов уринальной спермы травяной и гирканской лягушек проводили с каждым самцом 5 раз: через 1 час после инъекции гормона, затем через 3, 6, 9 и 24 часа. Сбор уринальной спермы остромордой лягушки осуществляли 2–3 раза в интервале времени 1–5 часов после инъекции сурфагона.

Для определения длительности жизни сперматозоидов образцы спермы помещали в холодильник и хранили при температуре +4 °С в течение нескольких суток. Длительность жизни сперматозоидов при этой температуре определяли, подсчитывая процент подвижных сперматозоидов по отношению к их общему количеству. Количество подвижных сперматозоидов выявляли сразу после получения спермы, а затем через 1–5 суток хранения образцов спермы в холодильнике.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса тела самцов травяной лягушки, использованных в наших исследованиях, превосходила массу тела гирканской и остромордой лягушек в среднем в 1,3 и 1,9 раза, соответственно (табл. 1). При этом суммарная масса обоих семенников у травяной лягушки была более чем в 10 раз выше, чем семенников гирканской и почти в 40 раз выше семенников остромордой.

Анализируя изменения в течение суток, происходящие с уринальной спермой после гормональной инъ-

екции (табл. 2, 3), можно отметить практически полное отсутствие динамики по таким показателям, как общая и поступательная подвижность спермиев у травяной лягушки и некоторое их снижение у гирканской лягушки. Объем спермы у обоих видов в течение суток несколько увеличивается, а их концентрация резко падает.

Оценивая суммарное количество сперматозоидов ($\times 10^6$) в образцах спермы, собранных за 24 часа, видно, что и по этим показателям сперма травяной лягушки значительно (в среднем в 38 раз) превосходит сперму гирканской лягушки: $353,7 \pm 112,2$ против $9,3 \pm 2,4$.

Таблица 1

Масса тела и суммарная масса семенников у трех видов бурых лягушек

Вид	<i>n</i>	Масса тела, г	Масса семенников, г	Отношение массы семенников к массе тела, %
Травяная лягушка	10	$44,3 \pm 0,8$	$0,38 \pm 0,040$	$0,90 \pm 0,002$
Гирканская лягушка	4	$34,7 \pm 0,7$	$0,03 \pm 0,001$	$0,09 \pm 0,003$
Остромордая лягушка	4	$23,6 \pm 0,4$	$0,01 \pm 0,0002$	$0,04 \pm 0,001$

Таблица 2

Характеристика уринальной спермы травяной лягушки (*n* = 10), собранной через разные временные интервалы после гормональной инъекции сурфагона

Показатель	Временной интервал после инъекции, часы				
	1	3	6	9	24
Общая подвижность спермиев, %	$94,2 \pm 2,7$	$94,9 \pm 2,2$	$93,6 \pm 1,2$	$92,1 \pm 1,3$	$93,3 \pm 2,0$
Поступательная подвижность спермиев, %	$70,8 \pm 4,7$	$68,1 \pm 5,0$	$71,1 \pm 3,9$	$73,1 \pm 3,7$	$72,5 \pm 3,3$
Концентрация спермиев ($\times 10^6$ /мл)	$301,7 \pm 90,5$	$144,1 \pm 27,1$	$80,1 \pm 28,2$	$70,6 \pm 23,2$	$56,8 \pm 16,7$
Объем спермы, мл	$0,43 \pm 0,09$	$0,57 \pm 0,13$	$0,49 \pm 0,14$	$0,49 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,11$
Общее количество спермиев в образце спермы ($\times 10^6$)	$96,2 \pm 13,7$	$98,3 \pm 36,1$	$66,7 \pm 33,8$	$46,6 \pm 19,6$	$46,2 \pm 15,6$

Таблица 3

Характеристика уринальной спермы гирканской лягушки (*n* = 5), собранной через разные временные интервалы после гормональной инъекции сурфагоном

Показатель	Временной интервал после инъекции, часы				
	1	3	6	9	24
Общая подвижность спермиев, %	$83,8 \pm 8,3$	$80,7 \pm 9,3$	$83,6 \pm 8,0$	$75,0 \pm 4,6$	$68,8 \pm 5,2$
Поступательная подвижность спермиев, %	$56,7 \pm 15$	$40,0 \pm 11$	$36,7 \pm 12$	$20,0 \pm 6$	$16,7 \pm 6$
Концентрация спермиев ($\times 10^6$ /мл)	$12,3 \pm 8,6$	$3,5 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,3$
Объем спермы, мл	$0,5 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
Общее количество спермиев в образце спермы ($\times 10^6$)	$5,2 \pm 2,2$	$1,6 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,2$

Таблица 4

Максимальная концентрация сперматозоидов в образцах уринальной спермы травяной, гирканской и остромордой лягушек

Показатель	Вид		
	травяная лягушка	гирканская лягушка	остромордая лягушка
Максимальная концентрация сперматозоидов в образцах уринальной спермы ($\times 10^6$ /мл)	990,0	38,0	25,0

Таблица 5

Изменение доли подвижных сперматозоидов (%) в уринальной сперме травяной и гирканской лягушек при хранении при температуре 4 °С в течение 5 суток

Вид	Продолжительность хранения, сут.					
	0	1	2	3	4	5
Гирканская лягушка	82,5	70,0	37,5	5,5	0	0
Травяная лягушка	97,2	97,2	96,5	84,2	65,5	51,0

По основным характеристикам уринальной спермы остромордая лягушка ближе к гирканской, чем к травяной: объем образца за одно получение составлял в среднем ($n = 5$) $0,4 \pm 0,1$ мл, концентрация ($\times 10^6$ /мл) спермиев – $3,9 \pm 0,9$ при общей подвижности спермиев $82,0 \pm 8,0$ %. Общее количество ($\times 10^6$) спермиев в образце спермы *R. arvalis* – $1,5 \pm 0,8$.

В целом, схожая картина наблюдалась и при сравнении максимальной концентрации сперматозоидов в образцах уринальной спермы трех исследованных видов бурых лягушек. Травяная лягушка по этому показателю в 26 раз превосходила гирканскую и почти в 40 раз – остромордую (табл. 4).

Травяная лягушка превосходила гирканскую и в экспериментах по определению длительности жизни уринальных сперматозоидов (табл. 5). Длительность жизни сперматозоидов гирканской лягушки при температуре хранения 4 °С ограничивалась 3 сутками, а у травяной лягушки даже после 5 суток хранения более 50 % сперматозоидов сохранили общую подвижность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что практически по всем характеристикам уринальной спермы травяная лягушка значительно превосходит и остромордую, и гирканскую. Полученные данные свидетельствуют, что относительная масса семенников травяной лягушки в 10 и 22 раза выше, чем у гирканской и остромордой лягушек, соответственно. Этот показатель хорошо коррелирует с превосходством травяной лягушки по средней и абсолютной максимальной концентрации, а также суммарному количеству сперматозоидов в каждой из проб получения спермы.

Несмотря на то, что гирканская лягушка – узкоареальный таксон, приуроченный в своем распространении исключительно к историческим границам лесов гирканского типа (горные системы Талыш, Эльбурс, Копетдаг, а также Южнокаспийская низменность), она демонстрирует высокое сходство в экологии с травяной лягушкой [4–6]. Оба сравниваемых вида являются доминантными компонентами в батрахофауне на большей части своих ареалов, населяют лесной пояс в широком диапазоне высот, зимуют преимущественно в воде, размножаются во всех доступных стоячих и слабопроточных водоемах. Основное отличие в репродуктивной биологии гирканской лягушки – очень длительный сезон размножения, длящийся в Юго-Восточном Азербайджане нередко с I декады января по III декаду апреля, т. е. не менее 3,5 месяцев [4, 5]. У травяной лягушки икрометание на одном водоеме длится всего 2–10 суток [6].

В течение всего нерестового периода большая часть самцов гирканской лягушки держится в водоемах и принимает участие в икрометании неоднократно. Вероятно, крайне экономный в сравнении с травяной лягушкой характер сперматогенеза, находящийся подтверждение в результатах наших исследований, позволяет экономить самцам гирканской лягушки репродуктивную энергию на весь длительный сезон размножения.

Возможно, эта версия может частично объяснить и различия в репродуктивных показателях травяной и остромордой лягушек. Несмотря на то, что оба этих вида симпатричны на существенной части своего ареала и имеют сходную биологию размножения, *R. arvalis*, в отличие от травяной лягушки, обладает более длительным периодом нереста (до 1 месяца на одном водоеме) [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гахова Э.Н., Утешев В.К., Шишова Н.В., Яшина С.Г. Криобанк геномов животных и растений в Институте биофизики клетки РАН // Биофизика живой клетки. 2006. Т. 8. Вып.: Консервация генетических ресурсов. С. 14-38.
2. Каурова С.А., Утешев В.К., Гахова Э.Н. Криоконсервация тестикулярных сперматозоидов серой жабы *Bufo bufo* // Биофизика живой клетки. 2008. Т. 9. Вып.: Консервация генетических ресурсов. С. 62.
3. Каурова С.А., Чекурова Н.Р., Мельникова Е.А., Утешев В.К., Гахова Э.Н. Сохранение оплодотворяющей способности спермы травяной лягушки *Rana temporaria* после криоконсервации // Консервация генетических ресурсов: материалы рабочего совещания. Пушино, 1996. С. 106-107.
4. Кидов А.А. К биологии гирканской лягушки (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidler, 1971) в Юго-Восточном Азербайджане // Современная герпетология. 2010. Т. 10. Вып. 3/4. С. 109-114.
5. Кидов А.А. Зимовка гирканской лягушки (*Rana macrocnemis pseudodalmatina* Eiselt et Schmidler, 1971) (Amphibia, Anura: Ranidae) в Талышских горах // Естественные и технические науки. 2012. Т. 58. № 2. С. 102-105.
6. Кузьмин С.Л. Земноводные бывшего СССР. М.: Товарищество научных изданий КМК, 1999. 298 с.
7. Утешев В.К., Гахова Э.Н. Перспективы создания криобанка геномов редких видов амфибий // Биофизика живой клетки. 1994. № 6. С. 27-32.
8. Browne R.K., Clulow J., Mahony M., Clark A. Successful recovery of motility and fertility of cryopreserved cane toad (*Bufo marinus*) sperm // Cryobiology. 1998. V. 37. P. 339-345.
9. Browne R.K., Li H., Robertson H., Uteshev V.K. et al. Reptile and amphibian conservation through gene banking and other reproduction technologies // Russ. J. Herpetol. 2011. V. 18 (3). P. 165-174.
10. Каурова С.А., Утешев В.К., Чекурова Н.Р., Гахова Э.Н. Cryopreservation of testis of frog *Rana temporaria* // Infusionstherapie und Transfusionsmedizin. 1997. V. 24. № 5. P. 378.
11. Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R.A. Motility and cryopreservation of spermatozoa of European common frog, *Rana temporaria* // Theriogenology. 2010. V. 74. № 5. P. 724-732.
12. Shishova N.R., Uteshev V.K., Kaurova S.A., Browne R.K., Gakhova E.N. Cryopreservation of hormonally induced sperm for the conservation of threatened amphibians with *Rana temporaria* as a model research species // Theriogenology. 2011. V. 75. № 2. P. 220-232.
13. Uteshev V.K., Gakhova E.N. Gene cryobanks for conservation of endangered amphibian species // Russ. J. Herpetol. 2005. V. 12. P. 233-234.
14. Uteshev V.K., Shishova N.V., Kaurova S.A., Manokhin A.A., Gakhova E.N. Collection and cryopreservation of hormonally induced sperm of pool frog (*Pelophylax lesssonae*) // Russ. J. Herpetol. 2013. V. 20. № 2. P. 105-109.

Поступила в редакцию 15 мая 2013 г.

Uteshev V.K., Kidov A.A., Kaurova S.A., Shishova N.V., Melnikova E.V., Kovalev A.V. COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF URINAL SPERM OF THREE SPECIES OF PALEARCTIC BROWN FROGS

Study of amphibian urinal sperm characteristics is an actual problem because of surge on interest to problems of cryobanking of animal genomes, in particular, to the problems of amphibian

urinal sperm cryobanking. The study presents comparative analysis of urinal sperm indices of three species of palearctic brown frogs: common frog *Rana temporaria*, moor frog *R. arvalis*, and Iranian long-legged frog *R. macrocnemis pseudodalmatina*. It was demonstrated that a common frog differs reliably from moor and Iranian long-legged frogs on such parameters as: spermatozoa concentration in urinal sperm; total amount of spermatozoa in a

sperm sample and spermatozoa life span. As the success rate of cryopreservation of amphibian urinal sperm depends on its mentioned parameters, the study should be useful for development of techniques for cryopreservation of palearctic brown frogs urinal sperm.

Key words: amphibians; brown frogs; urinal sperm; spermatozoa; cryopreservation.

УДК 597.94:591.147.8

ПЕРВЫЙ ОПЫТ РАЗМНОЖЕНИЯ ТРИТОНА КАРЕЛИНА, *TRITURUS KARELINII* (STRAUCH, 1870) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УРИНАЛЬНОЙ СПЕРМЫ ДЛЯ ОПЛОДОТВОРЕНИЯ ИКРЫ

© В.К. Утешев, А.А. Кидов, С.А. Каурова,
Н.В. Шишова, Е.В. Мельникова

Ключевые слова: земноводные; тритоны; искусственное оплодотворение; сперматозоиды; уринальная сперма. Тритон Карелина *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) – восточносредиземноморский вид, имеющий фрагментированный ареал. Последствия антропогенной деятельности приводят к крайне уязвимому положению этого тритона на Кавказе и особенно в Талыше. Возможной мерой поддержания его численности является разведение этого тритона в условиях неволи и возвращение выращенных животных в природные угнетенные популяции. В данной статье приводятся результаты первых положительных экспериментов по размножению тритона Карелина с использованием уринальной спермы для искусственного внутреннего оплодотворения икры.

ВВЕДЕНИЕ

Тритон Карелина *Triturus karelinii* (Strauch, 1870) – восточносредиземноморский вид, современный ареал которого представлен несколькими фрагментами, расположенными на юго-востоке Балканского полуострова, севере и западе Малой Азии, в южной части полуострова Крым, на Кавказе и в южном Прикаспии [3]. В Кавказском экорегионе тритон Карелина распространен в исторических границах широколиственных лесов, а его изолированные популяции в степной и горно-ксерофитной зонах являются реликтовыми [2]. Активное сведение лесов, загрязнение и зарыбление водоемов делает положение этого тритона на Кавказе крайне уязвимым. Вид внесен в Красные Книги Российской Федерации и Азербайджана.

В наиболее плачевном состоянии, по нашему мнению, находятся популяции *T. karelinii* в горнолесном поясе Юго-Восточного Азербайджана. Преобразование горных территорий приводит к расчленению ареала этого вида в Талыше и образованию изолированных микропопуляций, приуроченных к конкретным нерестовым водоемам и исчисляющихся сотнями и даже десятками особей. Нельзя исключать, что в ближайшем будущем важнейшим лимитирующим фактором для тритона Карелина на этом участке своего ареала станет угнетение популяций под действием инбредной депрессии.

Одной из наиболее действенных мер для восстановления вида в регионе является устройство незарыбляемых водоемов (например, для полива или поения скота). Так, на севере Азербайджана, в Шемахинском районе, именно наличие большого количества ското-

пойных прудов способствовало сохранению тритона Карелина после полного сведения лесов.

Кроме того, на наш взгляд, перспективным является поддержание численности существующих популяций и создание новых за счет разведения этого тритона в искусственных условиях. При воспроизводстве земноводных в лаборатории следует использовать все современные репродуктивные технологии, включая гормональную стимуляцию нереста, искусственное оплодотворение, кратковременное и длительное хранение репродуктивных клеток, криоконсервацию и криобанкирование. В данной статье приводятся результаты первых экспериментов по размножению тритона Карелина с использованием уринальной спермы для искусственного внутреннего оплодотворения икры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для наших исследований послужили взрослые особи тритона Карелина одной из наиболее изученных изолированных популяций горного Талыша – урочища Зарбюлюн [1]. Животных отлавливали в период их зимовки (1 декада января 2012 г.) в воде и в убежищах на суше. До использования в экспериментах тритонов содержали в специальном зимовальном помещении лаборатории криоконсервации генетических ресурсов ИБК РАН при круглосуточной температуре +6 °С. В зимовальном помещении животные находились в небольшом пластиковом контейнере с субстратом из сфагнового мха. В 1 декаде апреля тритоны, разделенные по полу, были переведены в два аквариума с уровнем воды 5 см и продолжали содержаться при тех же температурах. Перед началом опытов экспери-