

РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ГОУВПО «МАРИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ИНСТИТУТ МАТЕМАТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ПОЧВОВЕДЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

ПРИНЦИПЫ И СПОСОБЫ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

Материалы

III Всероссийской научной конференции

27 января – 1 февраля 2008 года

ЙОШКАР-ОЛА, ПУЩИНО
2008

БИОРАЗНООБРАЗИЕ ЗЕЛЕННЫХ ЛЯГУШЕК В КОСТРОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Тельминова Е.Ю., Колесова Т.М.

Костромской государственной университет им. Н.А. Некрасова, г. Кострома, Россия, postgrad@ksu.edu.ru

Особый интерес с точки зрения теоретической биологии представляет комплекс зеленых лягушек (*Rana esculenta* L., 1758), в котором присутствует вид гибридного происхождения. Как известно, на территории Восточной Европы группа зеленых лягушек представлена формой гибридного происхождения *R. esculenta* (съедобная лягушка) и двумя родительскими видами – озёрной лягушкой (*Rana ridibunda* Pall., 1771) и прудовой лягушкой (*Rana lessonae* Camerano, 1882). Чаще всего гибридная форма встречается только с одним из родительских видов. В этом случае воспроизводство гибридных «клонов» из поколения в поколение осуществляется посредством «полуклонального наследования». Скрещивание живущих рядом родительской и гибридной форм приводит к возникновению следующего поколения гибридов (Окулова, 2001).

В Нечерноземной зоне (в том числе в Костромской области) до 2001 г. не проводилось широких исследований зелёных лягушек. Следует отметить, что достоверная идентификация форм, составляющих

комплекс *R. esculenta* возможна лишь при использовании генетических методов (аллозимного анализа или ДНК-цитометрии), поэтому многие ранее опубликованные данные, полученные при использовании иных подходов, нуждались в ревизии.

С 2001 по 2006 гг. на базе КГУ им. Н.А. Некрасова совместно с Московским институтом экологии ведутся исследования по видовому многообразию амфибий, их экологическому состоянию, а также по инвазивности амфибий гельминтами. Доминирующим видом в исследованных районах (Вохомский, Кадыйский, Кологривский, Костромской, Макарьевский, Мантуровский, Островский, Судиславский, Сусанинский) является травяная лягушка (*Rana temporaria* L., 1758).

Новизна работы состоит в исследовании комплекса зеленых лягушек (биология, распространение, внутривидовое генетическое разнообразие, лабораторный диагноз видов). Проведены работы по уточнению видового состава зеленых лягушек области (присутствие зелёной лягушки) и возможного распространения гибридного вида в области, а также по изучению биологии комплекса зеленых лягушек.

В 2001 году по проекту были исследованы лягушки Островского района, окрестности пос. Островское. Лягушки в количестве 7 особей были доставлены в лабораторию живыми. Была проведена первичная обработка материала с помощью измерительного циркуля, с точностью 0,1 мм. В итоге от каждого экземпляра была получена серия промеров обычно используемых при работе с бесхвостыми амфибиями (Терентьев, Чернов, 1949; Тарашук, 1989).

Произведено описание окраски тела лягушек, были отмечены некоторые внешние неметрические признаки, обычно учитываемые при диагностике зеленых лягушек – форма внутреннего пяточного бугра, цвет резонаторов у самцов, степень перекрытия голеностопных сочленений при сгибании задних конечностей. У всех экземпляров определен пол и генеративное состояние.

От каждой лягушки была получена суспензия фиксированных на стадии метафазы клеток костного мозга для проведения в дальнейшем кариологического анализа. Сразу после забоя от каждого животного с помощью шприцов взято по две пробы крови из сердца. Одна из них использовалась для измерения количества ДНК в ядрах эритроцитов методом проточной ДНК-цитометрии. Для проведения аллозимного анализа помимо плазмы и клеток фракции крови у всех животных были выделены печень, почки, мускулатура бедра, сердце и селезенка.

Определение всех трех форм зеленых лягушек комплекса *R. esculenta* с помощью аллозимного анализа возможно с очень высокой достоверностью при исследовании нескольких диагностических локусов. В выборке животных анализировались различия по электрофоретической подвижности альбуминов плазмы, а также следующих белков мышечной ткани: аспаратаминотрансфераза ААТ-1, ААТ-2, малик энзим МЕ-1, МЕ-2, общий белок (мажорная фракция) и лактатдегидрогеназа LDH-1, LDH-2. Большинство из этих локусов являются диагностическими для пары видов *R. ridibunda* – *R. lessonae* (Межжерин, Морозов-Леонов, 1993). Электрофорез проводился в горизонтальном блоке 14% крахмального геля. Во всех случаях использовалась трис-цитрат-боратная буферная система («Poulik») – боратный электродный буфер (0,3 М борная кислота – 0,06 М гидроксид натрия, pH 8,2) и трисцитратный гелевый буфер (0,07 М трис – 0,005 М лимонная кислота, pH 8,7).

Помимо аллозимного анализа определение видовой принадлежности большей части зеленых лягушек выборки осуществлялось методом проточной ДНК-цитометрии: анализ проведен в Институте цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) Ю.М.Розановым (данный метод позволяет определять содержание ДНК в клеточных ядрах по количеству связывающегося с ней красителя, который измеряется фотометрически). Ранее было установлено, что геном озёрной лягушки на 16% превышает по объёму геном прудовой лягушки, содержание ДНК в геноме гибридов промежуточно. Помимо определения вида зеленых лягушек метод позволяет легко установить ploidy и «состав» генома исследуемых особей, а также продуцируемых ими гамет.

По результатам проведенной работы установлена видовая принадлежность всех отловленных зеленых лягушек. Диагностика большинства животных проведена параллельно методом проточной ДНК-цитометрии и аллозимного анализа. При данных условиях лишь по двум локусам из всех вышеперечисленных возможно надежное определение форм составляющих комплекс *R. esculenta* – ААТ-2 и LDH-1. У прудовых лягушек выявлен один вариант LDH-1, он отличается от всех четырех аллелей этого фермента, обнаруженных у *R. ridibunda*.

Таким образом, среди исследованных животных гибридов не отмечено. Выборки представлены прудовыми лягушками. Результаты видовой диагностики зеленых лягушек, полученные методом проточной ДНК-цитометрии, полностью совпали с данными аллозимного анализа. Все исследованные зеленые лягушки оказались диплоидными.

На генетически типированных экземплярах проверена пригодность для диагностики форм комплекса *R. esculenta* некоторых использовавшихся ранее морфологических критериев. Так, С.В. Тарашуком (1985, 1989) специально для определения зеленых лягушек был предложен так называемый мультипликативный индекс (I^{N}). У изученных лягушек Костромской области I^{N} варьировал в пределах 12,4-22,0, что подтверждает полученные результаты.

Сделанные выводы являются предварительными. Для того чтобы сделать окончательные выводы о зеленых лягушках, необходимо исследовать гораздо больший материал, отработать методы исследований, поскольку с данными видами, их северными популяциями исследования кариологии (дифференциальная окраска и др.), электрофореза пока не проводились. При дополнении последующими сборами, материал по зеленым лягушкам будет достаточно новым для науки. Съедобная лягушка непременно должна быть найдена, т.к. она обнаружена в близлежащей Ивановской области (Окулова, 2001).

Литература

Межжерин С.В., Морозов-Леонов С.Ю. Популяционно-генетический анализ структуры гибридных популяций *Rana esculenta* L. complex (*Amphibia, Ranidae*) // Цитология и генетика. – 1993. – Т. 27, вып. 2. – С. 63-68. Окулова И.М. Земноводные и пресмыкающиеся Нечерноземной зоны как компонент природного ландшафта и индикатор антропогенных воздействий. – Сводный отчет № Е-118. – М., 2001. – С. 6-53. Таращук С.В. К методике определения европейских зеленых лягушек группы *Rana esculenta* // Вестник зоологии. Киев, 1985. Вып. 3. С. 83-85. Таращук С.В. Схема морфометрической обработки представителей семейства настоящих лягушек (*Ranidae*) // Руководство по изучению земноводных и пресмыкающихся. – Киев, 1989. – С. 73-74.