

Е. А. Байtimiрова, Т. А. Мельникова

## МЕЖПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ УРИНАЛЬНОЙ СПЕРМЫ САМЦОВ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ (*RANA ARVALIS* NILSSON, 1842)\*

Проведена оценка концентрации и подвижности сперматозоидов у остромордой лягушки в нативных образцах уринальной спермы животных. Самцы (57 экз.) были отловлены в весенний период в трех водоемах с различным гидрохимическим составом. Образцы уринальной спермы животных были получены после гормональной стимуляции животных ГРГ — синтетическим аналогом люлиберина (Сурфагон). Отмечено, что у амфибий из фонового водоема концентрация сперматозоидов выше в сравнении с другими местообитаниями. Максимально отмеченное значение — 110 млн/мл. При этом в данном местообитании у самцов наблюдается минимальное количество подвижных сперматозоидов. Более 95 % сперматозоидов в изучаемых образцах уринальной спермы демонстрировали подвижность только на месте (*in situ*). Случаи поступательной подвижности единичны. Высказывается предположение о том, что наблюдаемый факт, вероятно, связан с величиной осмотического давления мочи животных, а также может быть следствием паразитарной инвазии у самцов амфибий. Библиогр. 2 назв. Ил. 2. Табл. 1.

*Ключевые слова:* амфибии, остромордая лягушка, размножение, сперматозоид, уринальная сперма, гормональная стимуляция, гидрохимия, минерализация.

Е. А. Baitimirova<sup>1</sup>, Т. А. Melnikova<sup>2</sup>

### INTERPOPULATION VARIABILITY URINAL MALE SPERM OF THE MOOR FROG (*RANA ARVALIS*, NILSSON, 1842)

<sup>1</sup> Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch RAS, 202, ul. 8 Marta, Ekaterinburg, 620144, Russian Federation; bay\_81@mail.ru

<sup>2</sup> The Ural State Mining University, 30, ul. Kujbysheva, Ekaterinburg, 620144, Russian Federation; tancko.melnikova@yandex.ru

We assessed the concentration and motility of spermatozoa in native urinal sperm samples of the moor frog. Males (57 ind.) were caught in spring in three water pools different of hydrochemical composition. Samples urinal sperm were obtained after hormonal stimulation of animals by synthetic analogues of GRH (Surfagon). Sperm concentration was higher in amphibians from reservoirs with a background mineralization than that in other locales. The maximum marked value was 110 million / ml. It is worth noting that in this locality we observed the minimal number of motile spermatozoa in males. More than 95 % of spermatozoa in the samples studied showed motility only *in situ*. We very rarely observed progressive motility of spermatozoa. It is suggested that the fact is probably due to the magnitude of the osmotic pressure of the urine of animals, and can also be a consequence of parasitic infestation in male amphibians. Refs 2. Figs 2. Tables 1.

*Keywords:* amphibians, moor frog, reproduction, spermatozoa, urinal sperm, hormonal stimulation, hydrochemistry, mineralization.

Для земноводных уровень воспроизводства популяций в значительной степени зависит от условий среды. Высокая разнородность среды обитания ведет к адаптивным преобразованиям сперматогенных циклов. Практически все земно-

---

Е. А. Байtimiрова (bay\_81@mail.ru): Институт экологии растений и животных УрО РАН, Российская Федерация, 620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202; Т. А. Мельникова (tancko.melnikova@yandex.ru): Уральский государственный горный университет, Российская Федерация, 620144, Екатеринбург, ул. Куйбышева, 30.

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-0431097, руководитель — Е. А. Байtimiрова.

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

водные являются обитателями пресных вод, однако водоемы их обитания могут существенно отличаться по уровню минерализации. Минерализация является одним из ведущих факторов, изменяющих осмотическое давление (осмоляльность) водных растворов. С изменением осмотического давления напрямую связан механизм активации подвижности сперматозоидов у животных, размножающихся в воде. При этом вопрос об адаптивных физиологических реакциях сперматозоидов амфибий к местным осмотическим условиям остается открытым [1]. Стоит отметить, что в настоящее время в программах по сохранению редких и исчезающих видов амфибий для целей криоконсервации преимущество отдается именно уринальной сперме, полученной от гормонально стимулированных животных [2]. В связи с этим, изучение базовых характеристик уринальной спермы из природных популяций амфибий, а также показателей ее изменчивости при действии негативных факторов является актуальной задачей. Цель данной работы — оценить концентрацию и подвижность уринальных сперматозоидов остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson, 1842) из местообитаний с различными гидрохимическими показателями.

### Материал и методика

Отловы животных были проведены в мае 2014–2015 гг. в трех местообитаниях: (1) водоем в лесопарке Шарташ г. Екатеринбурга; (2) в качестве водоема, характеризующего фоновый уровень естественной минерализации природных вод Среднего Урала, был использован водоем в окрестностях пос. Верхние Серги Свердловской области; (3) водоем на территории Курганской области в окрестностях пос. Степное. Для оценки качества половых продуктов амфибий был проведен опыт по гормональной стимуляции животных. Всего в опыте было использовано 57 половозрелых самцов остромордой лягушки, отловленных в период нереста животных: 25, 17, 17 экз. соответственно местообитаниям (1), (2), (3). В лаборатории самцам был инъецирован синтетический аналог гонадотропного релизинг гормона — люлиберина (сурфагон) в дозе 1,2 мкг/гр массы тела. Через один-пять часов путем мягкого массажа брюшной области однократно получали порцию спермы. Концентрацию сперматозоидов в образцах определяли с помощью специальной камеры — ММС-SK. Данная счетная камера является аналогом камер типа Маклера и позволяет использовать неразбавленный нативный материал для анализа. Счетное поле камеры представляет собой сетку с ячейками (квадратами) размером  $0,01 \times 0,01$  мм. Сперматозоиды свободно движутся и располагаются в одной плоскости. Количество сперматозоидов в десяти квадратах равно количеству в млн шт. на 1 мл эякулята. Статистическую обработку данных проводили с помощью обобщенных линейных моделей (GLM): однофакторного дисперсионного анализа для непрерывной переменной, логистической регрессии (англ. — logit model) для бинарных переменных, реализованных в пакете прикладных программ Statistica. При проверке гипотез о значимости факторов выбран 5 %-ный уровень значимости.

## Результаты и обсуждение

Основные гидрохимические показатели изучаемых водоемов в весенний период, когда проходит нерест амфибий, представлены в таблице. Водоем на территории г. Екатеринбурга (1) характеризуется высоким, по сравнению с другими участками, уровнем сульфатов. Концентрация ионов калия и магния соответствует уровню минерализованного водоема (3). Местообитание (2) характеризуется средним уровнем минерализации и низким уровнем перманганатной окисляемости. В водоеме в окрестностях пос. Степное отмечен максимальный из наблюдаемых уровень естественной минерализации воды и натрия (таблица).

Основные гидрохимические показатели водоемов (май)

Определяемые показатели	Местообитание		
	Шарташ (1)	В. Серги (2)	Степное (3)
	$M \pm m$	$M \pm m$	$M \pm m$
Водородный показатель, ед. рН	6,43±0,19	7,41±0,025	7,69±0,31
Минерализация, мг/дм <sup>3</sup>	237,85±88,55	153,85±41,05	295,45±12,55
Окисляемость перманганатная, мг О <sub>2</sub> /дм <sup>3</sup>	38,0±30,0	18,88±15,12	18,40±11,6
Сульфаты, мг/дм <sup>3</sup>	114,15±55,55	25,4±6,6	5,11±1,52
Натрий, мг/дм <sup>3</sup>	10,91±1,49	4,76±0,78	53,8±7,3
Кальций, мг/дм <sup>3</sup>	25,1±1,9	27,1±7,6	29,5±6,4
Калий, мг/дм <sup>3</sup>	9,4±1,71	1,21±0,25	10,1±1,81

Эффективность гормональной стимуляции препаратом сурфагон с целью получения половых продуктов самцов остромордой лягушки составила в среднем

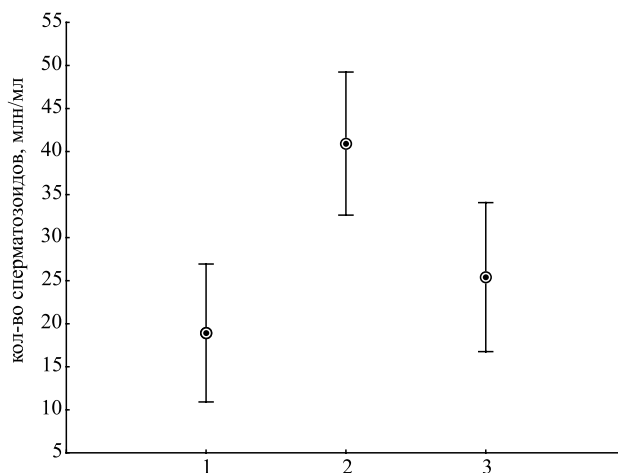


Рис. 1. Концентрация сперматозоидов в нативных образцах уринальной спермы остромордой лягушки (средние  $\pm$  0,95 доверительный интервал) при воздействии фактора «местообитание»:

$F(2, 75) = 7,5135, p = 0,001$ ; 1 — Шарташ; 2 — В. Серги; 3 — Степное.

68 % независимо от местообитания амфибий. Образцы уринальной спермы были получены у 39 самцов: 14, 13, 12 экз. соответственно местообитаниям (1), (2), (3).

Результаты однофакторного дисперсионного анализа числа сперматозоидов в нативных образцах уринальной спермы позволяют утверждать, что у амфибий из фонового водоема концентрация сперматозоидов выше (рис. 1). Максимально отмеченное значение — 110 млн/мл. Значимые различия наблюдаются между местообитаниями (1)–(2) (Post Hoc Test  $p = 0,0003$ ) и (2)–(3) (Post Hoc Test  $p = 0,01$ ) (рис. 1). У особей из минерализованного и городского водоемов средняя концентрация сперматозоидов примерно одинакова (20–25 млн/мл), значимых различий нет. Анализ частоты встречаемости подвижных сперматозоидов у самцов, населяющих изучаемые местообитания, проведен с помощью логит-регрессии для бинарных переменных (рис. 2).

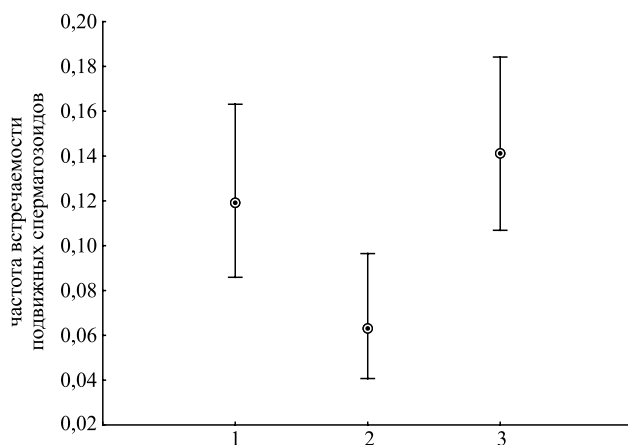


Рис. 2. Частота встречаемости подвижных сперматозоидов в нативных образцах уринальной спермы остромордой лягушки:

Wald  $X^2(2) = 10,57, p = 0,005$ ; 1 — Шарташ; 2 — В. Серги; 3 — Степное.

Более 95 % сперматозоидов демонстрировали подвижность только на месте (in situ). Случаи поступательной подвижности единичны. Показано, что реже всего подвижные сперматозоиды встречаются у самцов из загородной популяции (2). Подвижность сперматозоидов в уринальной сперме амфибий до ее контакта с внешней водной средой связана с физиологическими особенностями особи. Предполагается, что в оптимальных для существования вида условиях окружающей среды качество половых продуктов должно быть высоким. Уровень минерализации воды и различные органические примеси могут оказывать прямое воздействие на физиологическое состояние амфибий и, как следствие, изменять концентрацию и подвижность спермиев. В нашем случае образцы с максимальной концентрацией сперматозоидов соответствовали животным, населяющим биотоп с фоновым уровнем минерализации (2). При этом была отмечена низкая подвижность спермиев у животных из этого водоема в сравнении с другими местообитаниями. Наблюдаемый факт, вероятно, связан с величиной осмотического давления мочи животных, и не может быть однозначно интерпретирован в пользу снижения

оплодотворяющей способности сперматозоидов у самцов остромордой лягушки, населяющих местообитание (2), поскольку следует учитывать то, что подвижность спермиев амфибий усиливается после попадания в окружающую среду вследствие осмотического шока и влияния дополнительных компонентов (ионный состав, органические примеси) раствора.

Альтернативно, снижение подвижности сперматозоидов может свидетельствовать о наличии паразитарной инвазии у самцов амфибий, однако этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.

## Литература

1. Byrne P.G., Dunne C., Munn A.J., Silla A.J. Environmental osmolality influences sperm motility activation in an anuran amphibian // *Journal of Evolutionary Biology*. 2015. Vol. 28: European society for evolutionary biology. P. 521–534.

2. Утешев В. К., Кидов А. А., Каурова С. А., Шишова Н. В., Мельникова Е. В., Ковалев А. В. Сравнительная характеристика уринальной спермы трех видов палеарктических бурых лягушек // *Вестн. Томского гос. ун-та*. 2013. Т. 18, № 6. С. 3087–3090.

**Для цитирования:** Байtimiрова Е. А., Мельникова Т. А. Межпопуляционная изменчивость уринальной спермы самцов остромордой лягушки (*Rana Arvalis* Nilsson, 1842) // *Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология*. 2016. Вып. 3. С. 19–23. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.304

## References

1. Byrne P.G., Dunne C., Munn A.J., Silla A.J. Environmental osmolality influences sperm motility activation in an anuran amphibian. *Journal of Evolutionary Biology*, 2015, vol. 28: European society for evolutionary biology, pp. 521–534.

2. Uteshev V.K., Kidov A.A., Kaurova S.A., Shishova N.V., Mel'nikova E.V., Kovalev A.V. Sravnitel'naia kharakteristika urinal'noi spermy trekh vidov palearkticheskikh burykh liagushek [Comparative characteristic of urinal sperm of three species of palearctic brown frogs]. *Vestn. Tomskogo gos. un-ta* [Tomsk State University Journal], 2013, vol. 18, no. 6, pp. 3087–3090. (In Russian)

**For citation:** Baitimirova E. A., Melnikova T. A. Interpopulation variability urinal male sperm of the moor frog (*Rana Arvalis*, Nilsson, 1842). *Vestnik of Saint Petersburg University. Series 3. Biology*, 2016, issue 3, pp. 19–23. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.304

Статья поступила в редакцию 30 декабря 2015 г., принята 4 июня 2016 г.

## Сведения об авторах:

Байtimiрова Екатерина Александровна —

Мельникова Татьяна Анатольевна —

Baitimirova Ekaterina A. —

Melnikova Tatiana A. —