ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 597.841+574.21:611.013.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ СЕРОЙ ЖАБЫ (*BUFO BUFO*): МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Е.В. Дмитриева

Кафедра биологической эволюции, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: dmitrieva@aport.ru

Эмбриональные и личиночные стадии развития амфибий часто используются при проведении экспериментальных исследований в области биологии развития, токсикологии и медицины. Однако существующие методики проведения лабораторных экспериментов не учитывают особенности биологии модельных видов амфибий, а также не уделяют достаточного внимания стандартизации условий проведения экспериментов и минимизации влияния экспериментатора на их результат. Кроме того, не учитывается тот факт, что методика проведения экспериментальных исследований, разработанная для одного вида амфибий, не может использоваться для аналогичных исследований на другом виде без ее существенной модификации с учетом особенностей биологии данного объекта. В статье суммируются результаты многолетних исследований, посвященных изучению факторов, оказывающих влияние на результаты лабораторных экспериментов по изучению эмбриональных стадий развития серой жабы *Bufo bufo*. На примере этого вида разработаны новые методические подходы к проведению лабораторных исследований, позволяющие учитывать особенности биологии вида, минимизировать неоднородность воздействий ранее неконтролируемых факторов и стандартизировать условия проведения экспериментов. Рекомендуется на протяжении всего эксперимента поддерживать температуру на уровне 15°C, проводить регулярные измерения через одинаковые промежутки времени (8 ч), проводить каждое тестирование при двух значениях начальной плотности эмбрионов (рекомендуемые – 30 и 120 икринок в едином шнуре на стандартный аквариум). При постановке экспериментов следует учитывать влияние не только «объемной»(отношение количества эмбрионов к объему воды), но и «поверхностной» (отношение количества эмбрионов к площади поверхности), а также «линейной» (отношение количества эмбрионов к длине икряного шнура) плотности. Показано, что любое дополнительное воздействие на эмбрионы со стороны экспериментатора, связанное с удалением погибших особей, проводимое в процессе проведения экспериментов, может оказывать существенное влияние на результат, поэтому такие воздействия следует свести к минимуму.

Ключевые слова: *серая жаба, Bufo bufo, эмбриональное развитие, экспериментальные методы исследований, плотность икры, влияние температуры развития*

Амфибии широко используются в качестве модельных объектов в экологии, физиологии и биологии развития. Они сильно зависят от внешних условий – по сравнению, например, с млекопитающими – и поэтому являются хорошими индикаторами состояния окружающей среды. В настоящее время уделяется большое внимание использованию амфибий в качестве объекта биоиндикации и мониторинга состояния экосистем [1, 2], так как они широко распространены, на разных этапах онтогенеза являются то фито-, то зоофагами, легко доступны для изучения, биология большинства этих видов хорошо изучена, они многоплодны и сравнительно быстро воспроизводятся.

Серая жаба *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) является удобным модельным объектом для решения различных экспериментальных задач. Данный вид широко распространен от Западной Европы до Восточной Сибири [3]. Численность

на большей части ареала достаточно велика, т.е. одним из достоинств данного объекта исследований является доступность и легкость в сборе материала. Эмбриональные и личиночные стадии серой жабы легко изучать как в природных, так и в лабораторных условиях, большой размер кладки позволяет получать достаточное количество генетически однородного материала для проведения различных экспериментов. В настоящее время это один из самых изучаемых видов амфибий в Европе. Эмбриональные и личиночные стадии развития данного вида часто используют для целей биотестирования и биоиндикации [4–7]. Однако при постановке экспериментальных исследований по исследованию ранних стадий развития серой жабы часто не учитывают особенности биологии, характерные для данного вида. Структура кладки в сочетании с экологией икрометания накладывает определенные ограничения на проведение экспериментов с икрой амфибий в лабораторных условиях. Методику, разработанную для проведения лабораторных исследований на эмбриональных стадиях развития одного вида амфибий, невозможно без модификаций использовать при исследовании другого вида. Для проведения экспериментов по влиянию различных факторов на развитие амфибий требуется установить, как особенности биологии вида влияют на результаты проводимых экспериментов и каким образом можно минимизировать эти воздействия в процессе проведения исследования.

Кладка серой жабы представляет собой парный тяж общей длиной до десяти метров. Икра откладывается в виде шнуров, в которых содержится от 1002 до 6840 икринок, расположенных по спирали двумя рядами [3] (рис. 1А). В процессе икрометания самка жабы натягивает икряной шнур между стеблями водной растительности или различными подводными предметами. Скопления икры у серой жабы создаются за счет различной укладки икряных шнуров, переплетения и наматывания одних поверх других. Ранее мною было показано, что оптимальными условиями развития для икры серой жабы является натянутый икряной шнур, в котором наблюдаются низкая смертность, а также высокие темпы и высокая синхронность развития отдельных эмбрионов. В свернутом икряном шнуре наблюдается повышенная смертность примерно у трети всех исследованных кладок по сравнению с распрямленным икряным шнуром [8].

Кладка, например, другого широко распространенного модельного объекта – травяной лягушки *Rana temporaria* (Linnaeus, 1758) имеет типичную для всех лягушек форму комка, образующегося благодаря склеиванию слизистых лицевых оболочек и содержащего от 282 до 4300 икринок [3] (рис. 1Б). После набухания икряной комок всплывает и распределяется в толще воды, слизистые оболочки икринок слипаются друг с другом в местах соприкосновения, в других местах между ними остаются каналы, через которые кислород проникает к каждому из развивающихся зародышей. Таким образом, влияние плотности на развитие эмбрионов у травяной лягушки и серой жабы обусловлены разными особенностями структуры кладки этих видов.

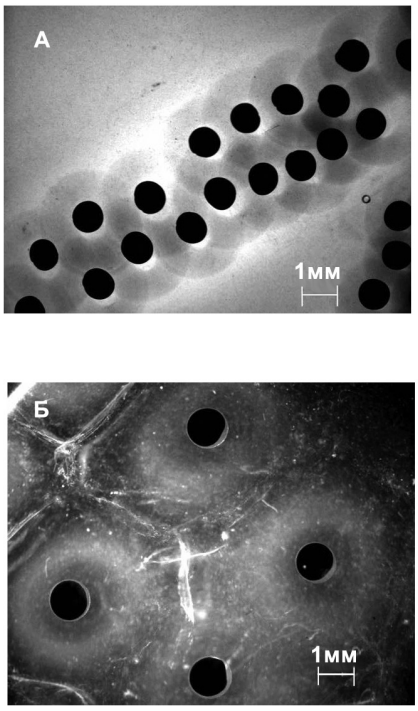

Рис.1. Расположение икринок в кладке. **А** – серая жаба, **Б** – травяная лягушка.

Кроме того, плотные скопления икры у некоторых видов лягушек имеют адаптивное значение. Например, *R. temporaria* проводит икрометание ранней весной и откладывает икру в холодную воду, а в скоплениях икры температура на несколько градусов выше, чем в окружающей среде, и суточные колебания температуры менее выражены [3]. В пределах одного региона серая жаба мечет икру значительно позже, чем травяная лягушка [9], в уже теплую воду: икрометание начинается, когда вода в пруду прогревается до 6–14°C [10]. Особи же *R. temporaria* появляются в водоемах еще до их полного освобождения ото льда, когда температура воды составляет всего 3–4°C [3]. Поэтому икра серой жабы, в отличие от икры травяной лягушки, не нуждается в студенистом комке для прогревания. Таким образом, температурная толерантность этих видов также может быть различна.

Следовательно, методику, разработанную для проведения лабораторных исследований на одних видах (например, на икре лягушки), нельзя распространять на исследования эмбриональных стадий развития других видов (например, серой жабы). Таким образом, для исполь-

зования в лабораторных исследованиях икры серой жабы целесообразно оптимизировать методику проведения экспериментов с учетом особенностей биологии вида.

Материалы и методы

Икра для экспериментов была получена естественным путем в лабораторных условиях от производителей, отловленных в состоянии амплексуса в период массового икрометания в трех водоемах Московской области: Стерляжий пруд (Звенигородская биостанция МГУ имени С.Н. Скадовского), верховое болото Шараповского лесничества Звенигородского лесхоза (Одинцовский район) и озеро Глубокое, являющееся эталоном природного объекта по чистоте воды (Рузский район). Пары производителей помещались в отдельные аквариумы размером 42×30×22 см и полезным объемом 21 л, в которых создавались условия, максимально приближенные к природным, для откладки икры. Для каждого эксперимента использовались зародыши, полученные от одной пары производителей, т.е. являющиеся полными сибсами, что существенно снижало вклад генетической компоненты изменчивости. Сразу после завершения процесса икрометания полученная икра рассаживалась по экспериментальным аквариумам. Для рассадки выбирались участки кладки, не имеющие видимых деформаций, что существенно снижало случайный вклад поврежденных эмбрионов и неоплодотворенных яйцеклеток в результирующую смертность. Все эксперименты на эмбрионах проводились от момента окончания икрометания, который принимался за нулевой, до момента вылупления личинок.

Была поставлена серия экспериментов по выявлению влияния особенностей биологии вида *B. bufo* (таких как структура кладки, экология икрометания, плотность эмбрионов и оптимальная температура развития [8, 11–13]) и ряда лабораторных факторов (например, геометрия аквариума или воздействие экспериментатора) на результаты исследований на эмбриональных стадиях развития. Для этого были проведены следующие эксперименты:

1. Оптимизация объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени. Было проведено исследование с определением оптимального интервала проведения измерений.

2. Подбор объема воды, необходимого для оптимального развития эмбрионов. Поскольку развитие амфибий происходит в водной среде, для проведения лабораторных исследований важно выявить необходимый и достаточный объем воды, а также оптимальную геометрию аквариума.

3. Исследование влияния экспериментатора при удалении погибших эмбрионов, а также при замене воды в аквариумах [11].

Оценка стадий развития проводилась с помощью таблиц нормального развития для серой жабы [14]. Для сравнения между собой темпов развития в различных экспериментах был использован показатель «индекс уровня развития» [9, 14], который оценивается по формуле:

$$X(t) = \frac{\sum_{i=1}^{J} (K(i) \cdot n(i))}{M(t)},$$

где $X(t)$ – индекс уровня развития эмбрионов в одном аквариуме в момент времени t; $M(t)$ – общее количество выживших икринок в момент времени t, J – количество выделенных стадий развития [14]; $n(i)$ – количество эмбрионов, находящихся на стадии развития i в момент времени t; $K(i)$ – условный коэффициент, присвоенный каждой стадии развития (дробление – 0, гаструла – 1 и т.д.; вылупление – 6). Условный коэффициент $K(i)$ присваивался таким стадиям развития, которые можно отличить на глаз от предыдущих стадий без использования микроскопа [15]. Таким образом, данный показатель учитывает разброс по стадиям развития и количество особей на каждой из стадий в определенный момент времени относительно общего количества выживших эмбрионов.

Результаты экспериментов на икре серой жабы были обработаны с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Company, США). Для оценки достоверности различий между выборками использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни; различия считали достоверными при $p<0,05$. Для сравнения между собой трех и более выборок применялся непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, который является обобщением критерия Манна-Уитни для случая трех и более выборок.

Результаты и обсуждение

В результате многолетнего изучения воздействия ряда факторов на эмбриональное развитие *B. bufo* в экспериментальных условиях были выявлены параметры, которые могут оказывать влияние на результаты лабораторных исследований. Эти факторы связаны как с особенностями биологии самого исследуемого вида, так и с эффектом используемого оборудования и влиянием экспериментатора. Рассмотрим воздействие исследованных факторов более подробно.

Влияние температуры. Температура окружающей среды является одним из наиболее важных факторов, влияющих на рост и развитие амфибий. Существует прямая зависимость между температурой и скоростью эмбрионального развития [16]. Чаще всего исследования в лабораторных условиях проводятся при температуре 19–20°C [14, 17]. В природных же условиях эмбрионы амфибий нормально развиваются при температуре около 15°C [18]. В результате проведенных экспериментов показано, что температура оказывает существенное влияние на темпы развития и смертность эмбрионов серой жабы [13]. Скорость эмбриогенеза серой жабы при температуре 19°C увеличивается почти в 1,4 раза по сравнению со скоростью развития при температуре 15°C: при 19°C время развития от момента оплодотворения до момента вылупления составляет примерно 95 ч, тогда как при 15°C – 130 ч. Кроме того, при более высокой температуре (19°C) в кладках с пониженной выживаемостью увеличивается и эмбриональная смертность к моменту вылупления (рис. 2) [13]. Следовательно, температура также оказывает некоторое влияние и на смертность эмбрионов серой жабы, но это влияние тесно связано со свойствами самой кладки. Таким образом, при проведении экспериментов в лабораторных условиях рекомендуется работать при пониженной температуре (15°C), близкой к природным условиям [18].

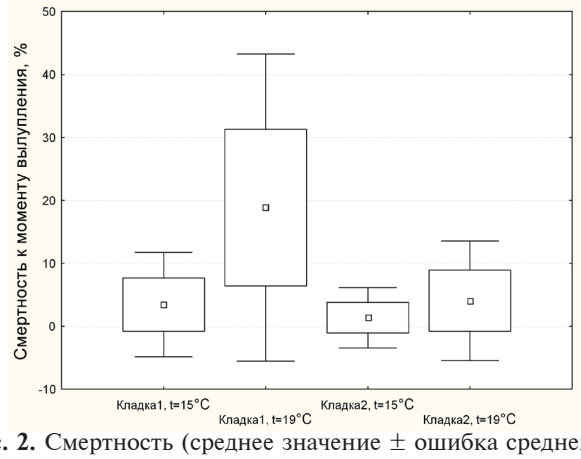

Рис. 2. Смертность (среднее значение ± ошибка среднего ± интервал 1,96 ошибки среднего) к моменту вылупления в двух кладках *Bufo bufo* в зависимости от температуры, при которой развиваются эмбрионы.

Влияние плотности и структуры кладки. Влияние плотности оценивают обычно по соотношению количества икринок и объема воды, в котором они развиваются. Возможно, это справедливо для лягушек: они откладывают икру в виде отдельных икринок, которые иногда слипаются в шарообразную или пастообразную массу. Кладка серой жабы представляет собой протяженные тяжи до нескольких метров длиной, различным образом распределенные в водоеме. Таким образом, различия в проявлении влияния плотности икры на развитие эмбрионов у травяной лягушки и серой жабы обусловлены разными особенностями структуры кладки этих видов (рис. 1). В результате многолетних исследований на эмбрионах серой жабы были выявлены различные типы плотности развивающейся икры серой жабы: «поверхностная», «объемная», «линейная» и плотность, заданная укладкой икряного шнура [8]. «Поверхностная» плотность – это количество икринок на единицу площади поверхности (дно аквариума). «Объемная» плотность – это отношение количества икринок к объему воды, в котором они развиваются. «Линейная» плотность – это отношение количества икринок к длине шнура, на которую он растянут. Также было показано, что поверхностная и линейная плотности, в отличие от объемной плотности, оказывают существенное влияние на темпы развития и смертность эмбрионов [8]. Оптимальным для развития икринок серой жабы является натянутый икряной шнур.

Кроме того, было выявлено два вида зависимости выживаемости эмбрионов от поверхностной плотности: монотонная (с увеличением плотности увеличивается и эмбриональная смертность) и немонотонная (возникает второй максимум выживаемости эмбрионов при высокой поверхностной плотности) (рис. 3) [8, 11–12]. Второй вид зависимости наблюдается в кладках, в которых смертность эмбрионов достаточно высока, т.е. общая жизнеспособность кладки ниже, чем в кладках с монотонной зависимостью смертности от плотности. В двух из трех исследованных водоемов наблюдались оба типа реакции на повышение плотности. Однако во всех кладках, полученных от производителей, отловленных на озере Глубокое, обнаружен только один вид зависимости выживаемости эмбрионов от поверхностной плотности – монотонный. Следует отметить, что во всех исследованных кладках из этого озера выживаемость была достаточно высокой (выше 90%), что характерно для кладок с монотонной реакцией смертности на повышение плотности развивающихся эмбрионов.

Таким образом, при постановке экспериментов в лабораторных условиях необходимо учитывать особенности реакции на плотность, которые могут возникать в популяциях, из которых берется материал для исследований. Следовательно, необходимо проводить каждое тестирование в условиях разной плотности

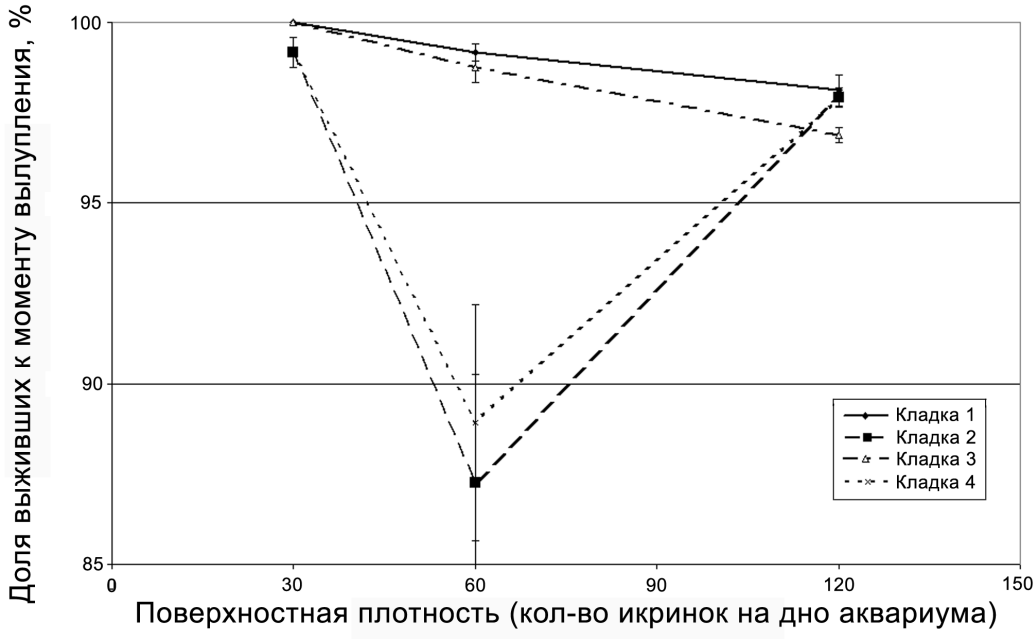

Рис. 3. Пример двух видов зависимости выживаемости эмбрионов *Bufo bufo* от поверхностной плотности к моменту вылупления по результатам исследований 2011 г. Кладки 1 и 3 – зависимость монотонная, т.е. с увеличением плотности увеличивается и эмбриональная смертность. Кладки 2 и 4 – зависимость немонотонная, т.е. возникает второй максимум выживаемости эмбрионов при высокой поверхностной плотности.

эмбрионов (рекомендуется – 30 и 120 икринок на стандартный аквариум [8, 12]) для получения наиболее полных данных по влиянию исследуемого фактора на эмбриональные стадии развития данного вида.

Оценка объема выборки и интервала времени проведения измерений. Для решения вопроса о минимальном объеме выборки и необходимом количестве повторностей эксперимента необходимо учитывать следующее. Объем выборки не может быть слишком большим из-за ограниченности исследования по времени, в средствах и числе исполнителей, но и не должен быть слишком маленьким в силу статистических и биологических соображений. Был применен метод систематической случайной выборки, при котором сначала случайным образом проводится первое измерение, а затем измерения проводятся через определенные интервалы (например, взятие образцов через равные расстояния в пространстве или проведение измерений через равные промежутки времени) [19]. Систематический отбор выборки, при котором выборка формируется неслучайными методами (например, через равные промежутки времени), не увеличивает систематическую ошибку, но существенно снижает объем выборки, необходимый для достижения нужного уровня точности проводимых исследований. Таким образом, мы можем поставить меньшее количество повторностей одного эксперимента для достижения оптимального уровня репрезентативности выборки.

Для оптимизации объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени была поставлена серия экспериментов. Икра помещалась в стандартные аквариумы по 30, 120 и 480 икринок. За начальную точку отсчета принимался момент завершения икрометания серой жабы. Количество умерших икринок и стадия развития фиксировались в одной серии экспериментов каждые 24 ч, в другой – через каждые 12 ч, в третьей – через каждые 8 ч. Также была проведена серия экспериментов с интервалами между проведением измерений 6, 8 и 10 ч.

В результате работы по оптимизации объема выборки путем проведения измерений через равные промежутки времени было показано, что оптимальными являются 8-часовые интервалы. При температуре 15°C время развития от момента завершения икрометания, который принимался за нулевой, до момента вылупления составило примерно 130 ч [13]. При большем интервале проведения измерений (12 или 24 ч) есть опасность пропустить ключевые стадии развития. При интервале проведения измерений 24 ч мы вообще пропускаем ключевые стадии развития с момента образования нервной трубки и до момента вылупления, а также саму стадию вылупления (проведение последнего измерения происходит примерно на 140-й ч с начала эксперимента). Детализация динамики смертности от стадии формирования нервной пластины II(9) до стадии вылупления III(2) [14], когда на смертность и развитие эмбрионов начинает оказывать влияния средовая компонента, также явно недостаточна при интервалах проведения измерений 12 и 24 ч.

При изменении интервала времени между измерениями от 6 до 8 или 10 ч детализация результатов эксперимента существенно не изменяется. Проводить подсчет количества умерших

эмбрионов и определять индекс уровня развития удобнее либо через 8, либо через 6 ч. Тогда можно спланировать время проведения измерений в течение суток, что существенно облегчает работу. Однако эксперимент с меньшим интервалом проведения измерений (через каждые 6 ч) показал, что повышения уровня детализации не происходит. Кроме того, сокращение интервала существенно затрудняет работу, так как эксперимент длится в течение нескольких суток. При этом увеличивается утомляемость экспериментатора, что может привести к снижению точности проводимых измерений. При 10-часовом интервале проведение измерений будет сдвигаться по времени в течение суток, что существенно затрудняет планирование эксперимента. Таким образом, оптимальным интервалом проведения измерений был выбран 8-часовой.

Исследование объема воды, необходимого для проведения экспериментов. Для эксперимента использовались стандартные аквариумы с площадью дна 44 см^2 и высотой столба воды 3 см (объем воды в аквариуме 0,13 л), 6 см (объем воды в аквариуме 0,27 л), а также 12 см (объем воды в аквариуме 0,53 л). Кроме того, был поставлен эксперимент в аквариумах с площадью дна 56,75 см^2 и 113,10 см^2 и высотой столба воды 3 см (объем воды – 0,17 л и 0,34 л соответственно). Таким образом, изменение объема воды в данных экспериментах задавалось с помощью изменения геометрии аквариумов. В результате серии экспериментов (одинаковая площадь дна аквариума, но разная высота столба воды), проводимой при плотности посадки 30 и 120 икринок на аквариум, было показано, что при объемах воды от 0,1 л до 0,5 л выживаемость эмбрионов серой жабы достоверно не различается. Результаты непараметрического теста Краскела-Уоллиса показывают отсутствие различий между исследуемыми группами (плотность 30: $H(2, n=12)=2,44$, $p=0,2946$; плотность 120: $H(2, n=12)=2,63$, $p=0,27$). Динамика смертности при разном объеме воды также не различается при любой плотности посадки (30 или 120 икринок на аквариум). Темпы развития эмбрионов (индекс уровня развития) в условиях данного эксперимента также не зависят от объема воды при плотности как 30, так и 120 икринок на аквариум. Критерий Краскела-Уоллиса также показывает отсутствие значимых различий между исследуемыми группами при плотности как 30 ($H(2, n=12)=4,563830$, $p=0,1021$), так и 120 ($H(2, n= 2)=1,884615$, $p=0,3897$) икринок на аквариум.

В следующей серии экспериментов при одинаковой величине столба воды (3 см), но разной площади поверхности дна (57 и 113 см^2 соответственно) смертность эмбрионов составила 2,71±1,50 в первом случае и 1,67±0,59 – во втором. Согласно критерию Манна-Уитни достоверных различий нет (U-критерий=7,00, $z=0,289$, $p=0,773$). По индексу уровня развития согласно критерию Манна-Уитни также нет достоверных различий (U-критерий=3,00, $z=1,440$, $p=0,149$).

Результаты этих экспериментов позволили выяснить, какой объем воды необходим и достаточен для нормального развития эмбрионов серой жабы. Показано, что изменение геометрии аквариума в пределах исследованных объемов воды не оказывает воздействия на результаты проводимых опытов. Однако для стандартизации условий проведения исследований в дальнейших экспериментах было решено принять за стандартный аквариум с площадью дна 44 см^2 и высотой столба воды 3 см (объем воды – примерно 0,13 л).

Влияние экспериментатора на результаты исследований. На результаты лабораторных исследований могут оказывать влияние причины, связанные с ошибками экспериментатора. В опытах по оценке влияния таких факторов на развитие и смертность одиночно развивающихся эмбрионов было показано, что самая высокая смертность наблюдается в опыте, в котором проводилась замена воды на аналогичный объем из аквариума, содержащего фрагмент развивающейся кладки серой жабы, самая низкая – в контроле, который развивался без дополнительных воздействий. Таким образом, самыми комфортными были признаны условия у эмбрионов, развивающихся без всякого воздействия со стороны исследователя [11].

Часто в процессе проведения экспериментов на эмбриональных и личиночных стадиях развития производят не только замену воды, но и удаление погибших особей [1, 2, 17]. При изъятии умерших головастиков или эмбрионов, которые развиваются независимо друг от друга (отдельные икринки, не имеющие общей оболочки), такое вмешательство может не оказывать существенного влияния на результат исследования, так как при этом происходит лишь перемешивание воды. При извлечении же погибших эмбрионов, которые развиваются в едином икряном шнуре, экспериментатору приходится нарушать целостность структуры кладки, разрушать единую защитную оболочку. В ходе проведения экспериментов показано, что такие действия приводят к увеличению смертности вместо ожидавшегося положительного эффекта [11].

Таким образом, любое дополнительное воз-

действие, связанное с удалением погибших особей, проводимое в процессе проведения лабораторных исследований, может оказывать существенное негативное влияние на результаты экспериментов.

Рекомендации по экспериментальному исследованию раннего развития серой жабы. На основе анализа литературных данных и результатов моих исследований показано, что особенности биологии вида (структура кладки, особенности икрометания, температура развития) оказывают влияние на результаты лабораторных экспериментов. Также в работе выявлены лабораторные факторы, которые должны учитываться при постановке опытов. На основе полученных данных разработаны рекомендации для проведения лабораторных исследований на эмбриональных стадиях развития серой жабы с учетом особенностей этого вида. Стандартизировать условия можно при соблюдении следующих условий:

- На протяжении всего эксперимента нужно поддерживать температуру на уровне 15–17°C;
- При постановке экспериментов следует учитывать влияние не только «объемной», но и «поверхностной», а также «линейной» плотности;
- Желательно выполнять регулярные измерения через одинаковые промежутки времени (8 ч), проводить каждое тестирование при двух значениях начальной плотности эмбрионов; рекомендуемые – 30 и 120 икринок в едином шнуре на стандартный аквариум с площадью дна 44 см^2 и высотой столба воды 3 см (объем воды в аквариуме 0,13 л);
- Избегать любых дополнительных воздействий на эмбрионы со стороны экспериментатора, связанных с удалением погибших особей, т.к. это может оказывать существенное влияние на результат.

Работа выполнена в рамках темы госрегистрации (№ АААА-А16-116021660031-5). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике МГУ. Автор заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dawson D.A., McCormick C.A., Bantle J.A.* Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX) // J. Appl. Toxicol. 1985. Vol. 5. N 4. P. 233–244.

2. *Herkovits J., Pérez-Coll C.S., Herkovits F.D.* Ecotoxicological studies of environmental samples from Buenos Aires area using a standardized amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX) // Environ. Pollut. 2002. Vol. 116. N 1. P. 177–183.

3. *Кузьмин С.Л.* Земноводные бывшего СССР. М.: Т-во научных изданий КМК, 2012. 370 с.

4. *Amicarelli F., Colafarina S., Cesare P., Aimola P., Di Ilio C., Miranda M., Ragnelli A.M.* Morphofunctional mitochondrial response to methylglyoxal toxicity in *Bufo bufo* embryos // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. Vol. 33. N 11. P. 1129–1139.

5. *Mandrillon A.L, Saglio P.* Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*) // Chemoecology. 2007. Vol. 17. N 1. P. 31–36.

6. *Bernabo I., Brunelli E., Berg C., Bonacci A., Tripepi S.* Endosulfan acute toxicity in Bufo bufo gills: Ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization // Aquat. Toxicol. 2008. Vol. 86. N 3. P. 447–456.

7. *Bernabo I., Bonaccia A., Coscarelli F., Tripepib M., Brunelli E.* Effects of salinity stress on Bufo balearicus and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na^+/K^+-ATPase localization // Aquat. Toxicol. 2013. Vol. 132–133. P. 119–133.

8. *Дмитриева Е.В.* Влияние структуры кладки серой жабы (*Bufo bufo*) на эмбриональное развитие // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 12. С. 1437–1449.

9. *Cooke A.S.* Spawn site selection and colony size of the frog (*Rana temporaria*) and the toad (*Bufo bufo*) // J. Zool. 1975. Vol. 175. P. 29–38

10. *Drobenkov S.M., Novitsky R.V., Kosova L.V., Ryzhevich K.K., Pikulik M.M.* The amphibians of the Belarus. Advances in amphibian research in the former Soviet Union, vol. 10. Sofia-Moscow: Pensoft, 2006. 168 p.

11. *Dmitrieva E.* The effects of density on mortality and development of the *Bufo bufo* eggs and tadpoles // Herpetologia Petropolitana / Eds. N. Ananjeva and O. Tsinenko. St. Petersburg, 2005. P. 130–133.

12. *Дмитриева Е.В.* Влияние плотности икры на темпы развития и смертность серой жабы (*Bufo bufo*) в лабораторных условиях // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 2. С. 229–235.

13. *Dmitrieva E.V.* Experimental study of the temperature effect on survival and development rates in the early ontogenesis of common toad (*Bufo bufo*) // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N. 2. P. 71–73.

14. *Cambar R., Gipouloux J.* Table chronologique du development embryonnaire et larvaire du crapaud commun *Bufo bufo* L. // Bull. Biol. Fr. Belg. 1956. Vol. 90. P. 198–217.

15. *Dmitrieva E.V.* Influence of the concentration of dissolved oxygen on embryonic development of the common toad (*Bufo bufo*) // Russ. J. Dev. Biol. 2015. Vol. 46. N. 6. P. 368–380.

16. *Moore J.A.* Temperature tolerance and rates of development in the eggs of amphibia // Ecology. 1939. Vol. 20. N. 4. P. 459–478.

17. *Дабагян Н.В., Слепцова Л.А.* Травяная лягушка *Rana temporaria* L. // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 442–462.

18. *Bachmann K.* Temperature adaptations of amphibian embryos // Am. Nat. 1969. Vol. 103. N 930. P. 115–130.

19. *Hayek L.-A.* Research design for quantitative amphibian studies // Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians / Eds. W.R. Heyer, M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.-A.C. Hayek, and M.S. Foster / Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1994. P. 21–38.

Поступила в редакцию 31.01.2019 г.
После доработки 19.06.2019 г.
Принята в печать 17.07.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF COMMON TOAD (*BUFO BUFO*): METHODOLOGICAL ASPECTS

E.V. Dmitrieva

Department of Evolutionary Biology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: dmitrieva@aport.ru

Embryos and larvae of many amphibian species are widely used as experimental models in the areas of developmental biology, toxicology and fundamental medicine. However, there are almost no experimental approaches considering the biology of particular species. Moreover, experimental conditions are not standardized between different laboratories, and there are no examples of making efforts to minimize an influence of the researcher's personality on the results of experiments. The worse thing is that many experimental methods designed for particular species are applied for other amphibians without an adaptation. In the presented paper, the results of long-term experimental investigations of environmental factors influencing embryonic development of the common toad *Bufo bufo* are summarized. These investigations are an example of establishing the methods and approaches considering the species biology, allowing minimizing heterogeneity of an influence of stochastic factors and standardizing experimental conditions. For this species, it is recommended to maintain the temperature at 15°C in the course of all experiments, to perform all measurements with 8 hr intervals, and to perform each test in at least two replicas, which differ in the initial density of embryos (clutch fragments containing 30 or 120 embryos per standardized aquarium). When designing experiments, it is suggested to consider not only volumetric density of embryos (the number of embryos per unit of volume), but also their surface density (the number per unit of area) and linear density (the number per unit of roe cord length). It was experimentally shown that it is necessary to keep the interactions between the researcher and the object at a minimal level, as all kinds of researcher actions, including removal of death embryos, severely affect the results of experiments.

Keywords: *common toad, Bufo bufo, embryonic development, experimental research method, egg density, effect of temperature on development*

Сведения об авторах

Дмитриева Елена Владимировна – канд. биол. наук, ст. инженер кафедры биологической эволюции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-01; e-mail: *dmitrieva@aport.ru*