

Московская гимназия на Юго-Западе № 1543
Кафедра биологии

**Реакция сеголеток
травяной лягушки *Rana temporaria*
на запах родного водоема**

Отчет о научно-исследовательской работе

Работу выполнили
ученицы 9 “Б” класса
Анна Чеченина
Марьяна Дубровская

Научные руководители:
С.В. Огурцов
П.А. Волкова

Москва, 2016 г.

Введение

Травяная лягушка (*Rana temporaria* (Linnaeus, 1758)) – сухопутный вид, принадлежащий к семейству настоящих лягушек. Этот вид широко распространён в Европе, его ареал простирается от Пиренеев до Зауралья и Западной Сибири (кроме центра и юга Пиренейского п-ова, южной Италии и южных Балкан до северо-востока Греции). Северо-западная граница ареала проходит в России от южного берега Баренцева моря и северного берега Белого моря на юго-восток и восток через республику Коми на реки Обь и Иртыш, затем в Курганскую обл. и северный Казахстан. В центре европейской части России – это один из самых многочисленных видов земноводных.

Размножение травяной лягушки происходит в марте – начале июня, кладки *R. temporaria* располагаются на мелководье (глубина 5–40 см), обычно с густой погруженной растительностью. Лягушка откладывает икру, через 5–15 сут из нее появляются головастики, через 3 месяца у них появляются задние и передние конечности, появляются пальцы. Эту стадию мы условно называем "хвостатая сеголетка" (рис. 1А). Далее начинается преобразование сеголетки, живущей в воде, в сеголетку, проводящую большую часть времени на суше (называемую нами "бесхвостой"). Пищеварительный тракт приспособляется к животной пище и роговые зубы, которые головастик использует для поедания детрита и растений, исчезают. При выходе из воды исчезают жабры, а их функции перенимают легкие, также развивается кожа с большим количеством желез. Рот и челюсти принимают новую форму и увеличиваются, чтобы более взрослым особям было удобнее ловить мух и других насекомых. "Бесхвостых" сеголеток мы определяли по следующим признакам: хвост короче 0,5 см, другая форма ротового отверстия и расположение глаз (рис. 1) – они с боков перемещаются на верхнюю часть головы и становятся "выпученными" (рис. 1Б). Затем хвост и вовсе исчезает, и бесхвостые сеголетки превращаются во взрослых особей (метаморфоз завершается в июне – августе) (Кузьмин, 2012; Никитина, 2016).



Рис. 1. Две основные стадии развития сеголеток травяной лягушки
Стрелочки указывают на глаз, относительно которого можно измерить длину ротового отверстия.

А – хвостатая (хвост >0,5 см; глаза по бокам; ротовое отверстие маленькое)
Б – бесхвостая (хвост <0,5 см; глаза на верхней части головы; ротовое отверстие больше)

Способность амфибий запоминать химические стимулы в ходе эмбрионального и личиночного развития изучается давно. Для *R. temporaria* показана способность запоминать искусственные химические стимулы в позднем эмбриональном развитии и формировать реакцию на них после метаморфоза (Hepper, Waldman, 1992; Бастаков, 1992). Существует гипотеза о том, что запоминание головастиками химических стимулов выступает в роли одного из механизмов, регулирующих ориентацию относительно родного водоема. Показано, что характер реакции на знакомые стимулы зависит от стадии развития сеголетки (Грубман и др., 2006).

Запоминание запаха родного водоема нужно сеголеткам, не прошедшим метаморфоз полностью, чтобы оставаться вблизи своего родного водоема до самого конца метаморфоза. После метаморфоза у сеголеток травяной лягушки есть стадия накопления (прил. 1). В этот период сеголетки в массе скапливаются у берега родного пруда до полного завершения метаморфоза и наступления благоприятных условий (влажности и температуры) для выхода на сушу. Затем бесхвостые сеголетки покидают водоем и при этом отвергают источники его запаха (Огурцов, 2012).

Таким образом можно выделить основную цель и задачи нашего исследования.

Цель: проверить, используют ли сеголетки травяной лягушки запах родного водоема как один из ориентиров и установить соответствие между стадией развития сеголеток [хвостатая/бесхвостая] и их реакцией; узнать, как влияют различные погодные условия на активность сеголеток.

Задачи:

1. Узнать, как реагируют сеголетки на разных стадиях развития на влажность среды.
2. на воду из родного водоема.
3. Узнать, стремятся ли сеголетки сбиваться в группы.
4. Проверить, влияют ли погодные условия (влажность, дождь, температура воздуха) на число активных сеголеток вблизи водоема.

Материалы и методы

Исследование проводили в период с 28 июня по 14 июля 2016 г. Под наблюдением находился водоем “Красная горка” на территории Звенигородской биологической станции МГУ (ЗБС, Одинцовский район Московской области). Во время проведения наших наблюдений он был пересохшим и большую часть водоема покрывала сухая трава (под ней все же была вода), по которой могли предвигаться сеголетки.

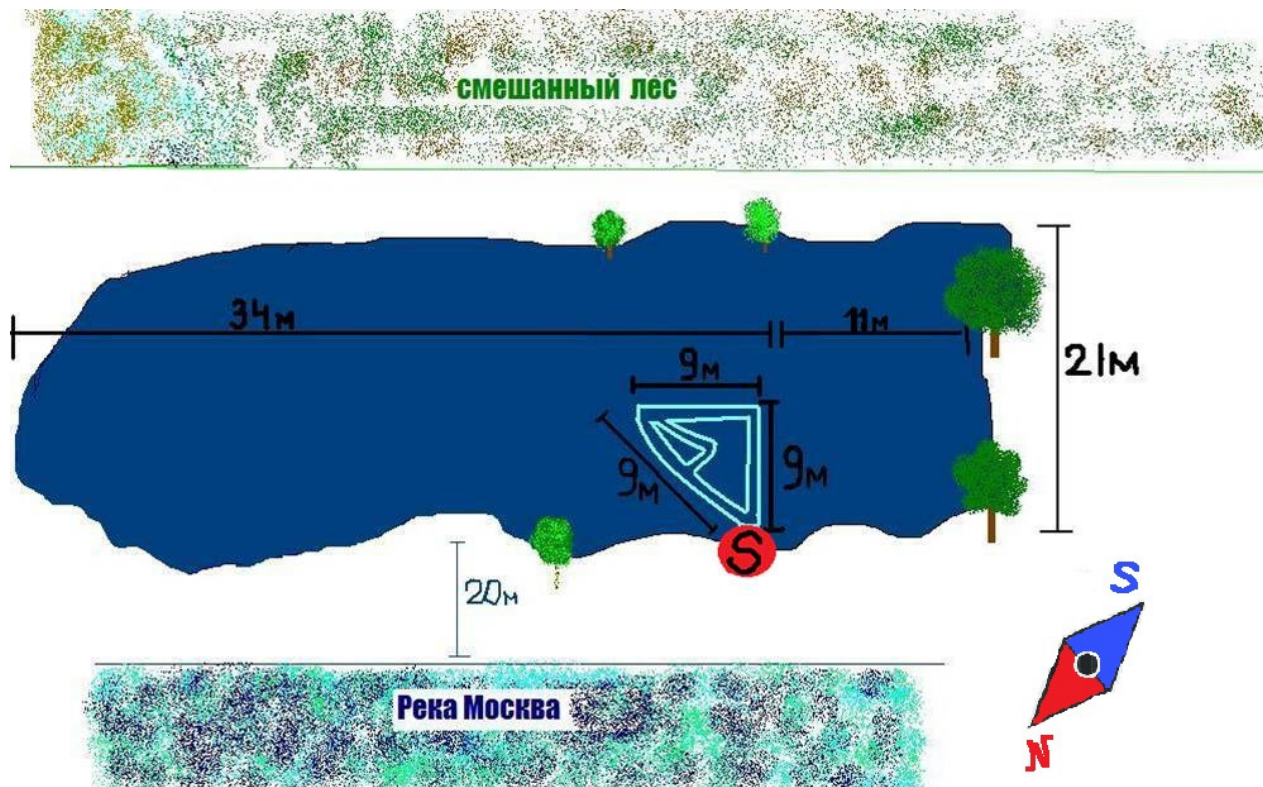


Рис. 3. Расположение водоема “Красная горка” и учетного маршрута

S – стартовая позиция учетчиков

Границы маршрута помечены светло-голубой линией

Мы проводили учеты числа активных сеголеток в водоеме, чтобы проверить зависимость этого числа от времени и погодных условий. Всего провели 12 учетов в разные дни и в разное время суток (рис. 2). Перед учетом снимали показания текущей температуры и влажности воздуха с помощью электронного термометра и гигрометра, затем сверяли показания приборов с метеостанцией. Считали сеголеток, сидящих на учетной тропинке, которая была шириной 30 см, и на расстоянии до 30 см возле неё. Два учетчика шли навстречу друг другу от точки старта (рис. 3, 4).



Рис. 4. Траектория движения учетчиков по маршруту
S – стартовая позиция учетчиков

Отловленных в водоеме сеголеток переносили на территорию ЗБС в пластиковых бутылках объемом 0.5 л с пятью отверстиями около крышки диаметром 1-3 мм (в бутылки наливали 10-20 мл воды из их водоема для более комфортной переноски). Всего по пути до места пересадки в контейнеры за всё время погибло 12 сеголеток. После переноски всю группу пересаживали в пластиковые прозрачные контейнеры объемом около 3 л с вентиляционными отверстиями в крышке, дно которых устилали влажным мхом, до транспортировки непосредственно в лабораторию. Там их тестировали в условиях парного выбора химических стимулов в пластиковой тест-камере длиной 76 см, шириной 12 см и высотой 15 см (Огурцов, 2004).

Тест-камера была разделена на пять отсеков вертикальными перегородками высотой 5 мм (рис. 5).

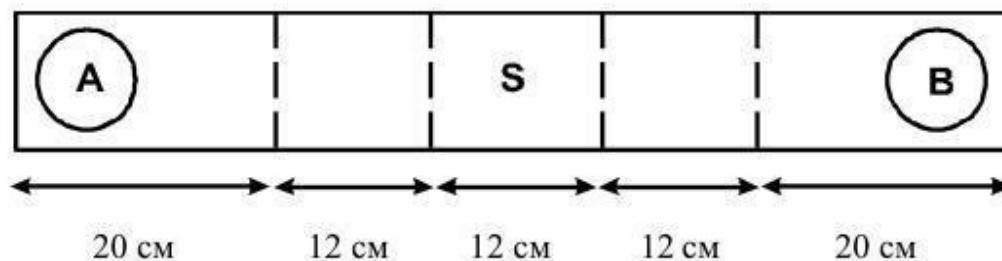


Рис. 5. Схема тест-камеры, вид сверху
A и B – чашка Петри с химическими стимулами,
S – стартовая позиция сеголеток, пунктир – перегородки между отсеками.

Съемный потолок тест-камеры был изготовлен из прозрачного органического стекла с вентиляционными отверстиями, расположенными на дальних концах. Тесты проводили в темноте в просторной комнате (примерно 80 м²). Все окна в комнате были заклеены черным полиэтиленом, закрыты картоном и занавешены плотными шторами. Единственным источником света являлась лампа накаливания мощностью 40 Вт, которой сбоку равномерно (лампа была установлена на высоте 70 см от пола и была направлена вниз) освещалась тест-камера на расстоянии 2 м от середины одной из длинных стенок камеры.

Стимулы находились в чашках Петри с двух сторон в крайних отсеках тест-камеры в виде водных растворов объемом примерно 20 мл (кроме тестов на группирование). После каждого теста камеру промывали водопроводной водой и насухо вытирали бумажными полотенцами. При тестировании каждую опытную группу делили на две или четыре подгруппы равного размера по пять или шесть (для тестов на группирование) особей, каждую сеголетку тестировали один раз. Каждую подгруппу тестировали в отдельной тест-камере. Всех сеголеток подгруппы помещали одновременно в середину тест-камеры под непрозрачный колпак, которым в нашем случае являлась пластиковая банка объемом 300 мл, и через 5 секунд колпак убирала. Далее каждый тест длился 40 мин, в течение которых через пятиминутные интервалы подсчитывали число сеголеток, находящихся в разных отсеках камеры. Мы выбрали такую продолжительность теста, поскольку по истечении 40 минут запахи химических стимулов смешиваются и сеголетки перестают их различать. Исходя из анализа индивидуальных траекторий движения особей при групповых тестах следует, что пятиминутный интервал между учетами положения сеголеток в отсеках является достаточным, чтобы объективно судить об их предпочтениях (Огурцов, 2004). Положение стимулов (справа/слева) в тест-камере изменяли для каждой следующей подгруппы, чтобы исключить влияние расположения отсека на результаты.

Каждый день для проведения экспериментов утром брали новую пробу воды из родного водоема, которую хранили в неплотно закрытой бутылке в тени.

- **Запах воды родного водоема** В этих тестах стимулами являлись вода из родного водоема и вода из р. Москва. В части тестов воду из родного водоема перед экспериментом разбавляли водопроводной водой в пять раз (результаты и обсуждение приведены только для основной части опытов – без разбавления).
- **Группирование** Задачей данных тестов являлась проверка того, стремятся ли сеголетки к себе подобным. Эксперименты проводились таким образом: крайняя секция пластикового контейнера отгораживалась прозрачным стеклом (не прилегающим к стеклянному “потолку”) и в нее отсаживались две сеголетки, еще четыре высаживались в центральный сектор. Остальная процедура опыта была аналогична опытам на запах и влажность. Маркерным отсеком в опытах на группирование мы называем отсек, ближайший к отсеку с отсаженными сеголетками.
- **Влажность** Задачей этих тестов на была проверка того, что все сеголетки, независимо от их возраста, предпочитают более влажную среду. В этих опытах стимулами являлись пустая и наполненная водопроводной водой чашки Петри.

Объем проведенной работы указан в таблице 1.

Таблица 1. Число опытов каждого типа (см. описание в тексте) и число исследованных в каждом типе опыта сеголеток

Тип опыта	Число опытов с бесхвостыми	Число опытов с хвостатыми	Число сеголеток в одном опыте	Общее число сеголеток
Запах воды родного водоема	20	9	5	145
Запах воды родного водоема, разбавление	3	1	5	20
Группирование	4	0	4	16
Влажность	6	11	5	85

Статистический анализ полученных данных мы проводили в программе R (R Core Team, 2013).

Результаты

Число сеголеток, используемых в каждом опыте, слишком мало для проведения статистического анализа (табл. 1). Даже если все пять сеголеток будут находиться в отсеке со стимулом, это не будет означать статистически значимого предпочтения, то есть того, что они так расположились не случайно (тест двух пропорций: $p = 0.07$). Поэтому мы можем лишь описать наблюдаемые закономерности без оценки их статистической значимости.

Тесты на запах родного водоема

Число хвостатых и бесхвостых сеголеток в тестах на запах родного водоема, находящихся в двух ближайших к стимулу отсеках, достоверно не различается (тест Вилкоксона: $p = 0.15$). В этих отсеках может быть любое число сеголеток (рис. 6).

Число хвостатых сеголеток в маркерном и противоположном отсеках достоверно не различается (тест Вилкоксона: $p = 0.12$).

Однако как видно из таблицы 2, бесхвостые сеголетки чаще бывают в маркерном отсеке, чем в противоположном, и эти различия статистически значимы (тест Вилкоксона: $p = 1.16 \times 10^{-5}$), как и различия между числом сеголеток в парах крайних отсеков (тест Вилкоксона: $p = 0.006$).

Таблица 2. Различия числа бесхвостых сеголеток в маркерном и предмаркерном отсеках в тестах на запах родного водоема.

	0	1	2	3	4	Число сеголеток в отсеке
Маркерный	15	37	73	47	4	Число таких случаев
Противоположный маркеру отсек	35	58	66	15	2	

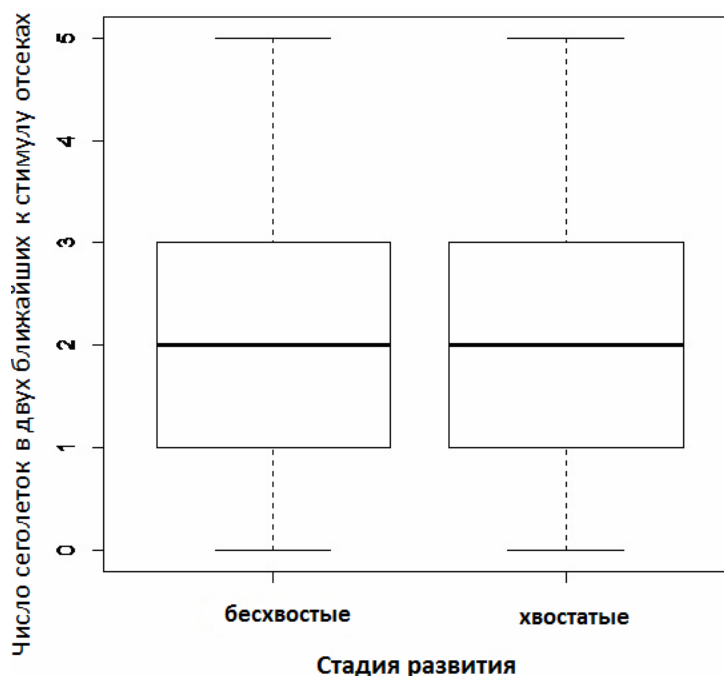


Рис. 6. Число сеголеток в двух ближайших к стимулу отсеках в тестах на запах родного водоема за все наблюдения

Выбросы, минимум и максимум, медианы и интерквартильные размахи

Тесты на группирование

В отсеке рядом со стимулом («маркерном») сеголетки бывают в любом количестве, а в отсеке, противоположном стимулу, чаще всего их нет вообще (рис. 7).

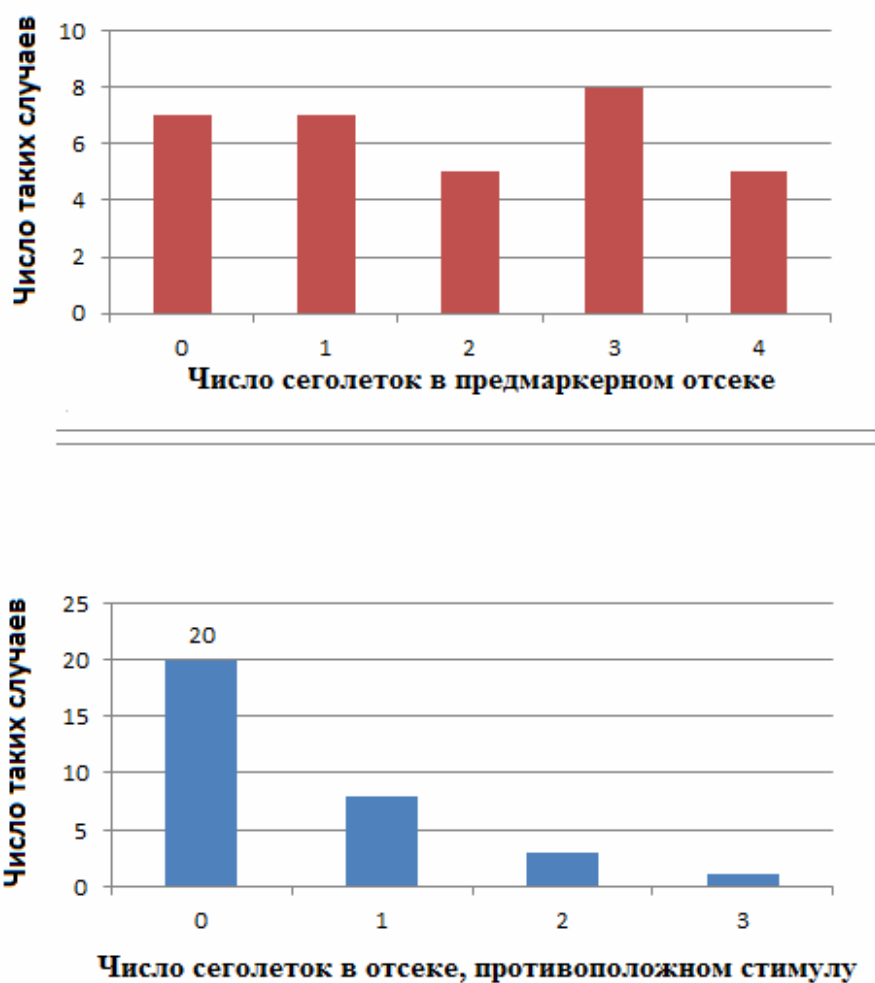


Рис. 7. Число бесхвостых сеголеток в маркерном отсеке и отсеке, противоположном стимулу в тестах на группирование

Тесты на влажность

В тестах на влажность в двух ближайших к стимулу отсеках может находиться любое число бесхвостых сеголеток (рис. 8). Хвостатые же в основном находятся в маркерном и предмаркерном отсеках в количестве двух или одной, и никогда не бывают там больше, чем втроем. Следовательно, мы можем сказать, что хвостатые скорее стремятся в зону с пониженной влажностью, и различия предпочтений бесхвостых и хвостатых статистически значимы (тест Вилкоксона: 0.01) (рис. 8).

Бесхвостые сеголетки предпочитают воду из родного водоема (табл. 3) и различия их числа в парах крайних отсеков и крайних отсеках статистически значимы (тест Вилкоксона: $p = 2.9 \times 10^{-6}$ и $p = 1.3 \times 10^{-6}$ соответственно).

Таблица 3. Различия числа бесхвостых сеголеток в маркерном и предмаркерном отсеках в тестах на влажность.

	0	1	2	3	4	Число сеголеток в отсеке
Маркерный	18	16	11	11	0	Число таких случаев
Противоположный маркеру отсек	42	14	0	0	0	

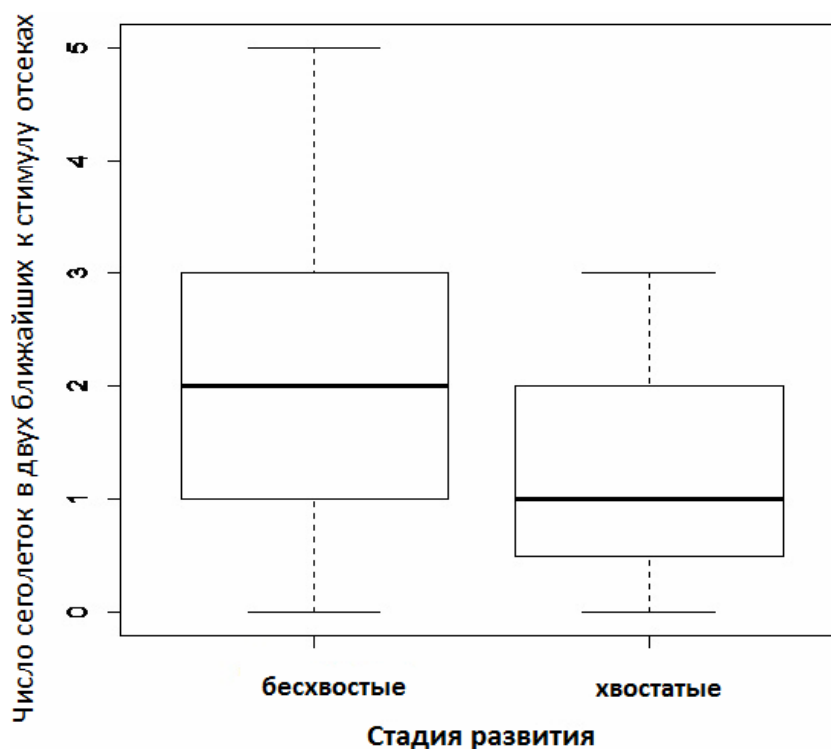


Рис. 8. Число сеголеток в двух ближайших к стимулу отсеках в тестах на влажность за все наблюдения

Выбросы, минимум и максимум, медианы и интерквартильные размахи

Все сеголетки по истечении первых пяти минут опыта мало переходят из одного отсека в другой. Бесхвостые бывают в двух ближайших к стимулу отсеках в любом количестве и по истечению пяти минут мало перемещаются, то есть корреляция между временем с начала опыта и количеством бесхвостых сеголеток очень слабая (коэффициент корреляции Спирмена: $p = 0.03$, $r = 0.15$). Хвостатые в основном находятся в двух ближайших к воде отсеках поодиночке или вдвоем, но бывают случаи, когда их там нет или их три. В случае хвостатых какие-либо статистически

значимые тенденции к изменению числа особей в двух ближайших к воде отсеках после после первых пяти минут опыта отсутствует (коэффициент корреляции Спирмена: $\rho = 0.19$, $r = 0.11$) (рис. 9, 10).

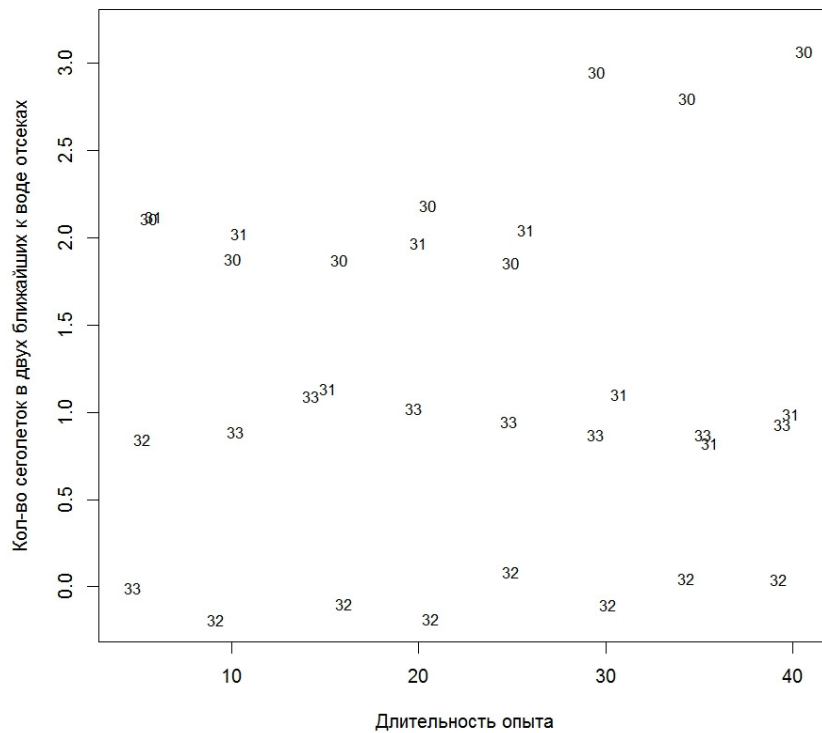


Рис. 9. Число хвостатых сеголеток, находящихся в двух ближайших к воде отсеках, в разное время с момента начала опыта на влажность
 Цифрами обозначены номера опытов.
 Для того чтобы избежать наложения точек, они случайным образом смещены относительно реального значения.

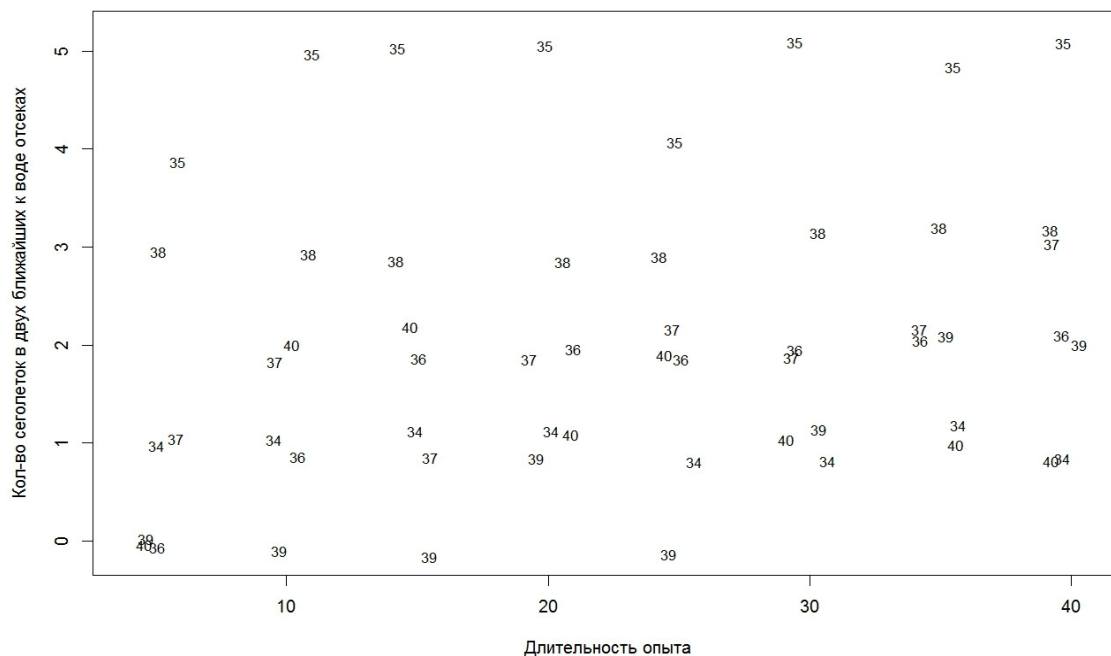


Рис. 10. Число бесхвостых сеголеток, находящихся в двух ближайших к воде отсеках, в разное время с момента начала опыта на влажность
 Цифрами обозначены номера опытов. Для того чтобы избежать наложения точек, они случайным образом смещены относительно реального времени.

Учеты

Если дождь шел (при этом влажность воздуха могла быть низкой или высокой), то сеголеток было в среднем в два раза больше, чем когда дождя не было. Когда дождя не было, была низкая влажность, и сеголеток всегда было мало (рис. 2, 11). Различия числа сеголеток при наличии дождя и его отсутствии статистически значимы (тест Вилкоксона: $p = 2.7 \times 10^{-5}$).

Во время дождя активных сеголеток значительно больше, чем как перед дождем, так и после него (рис. 2).

Число активных сеголеток не зависит от температуры воздуха (рис. 10), поскольку есть случаи, когда температура высокая и сеголеток мало (13:00, 2 июля), температура высокая и сеголеток много (11:00, 1 июля), температура низкая и сеголеток мало (15:00, 5 июля) и температура низкая и сеголеток много (18:00, 28 июня).

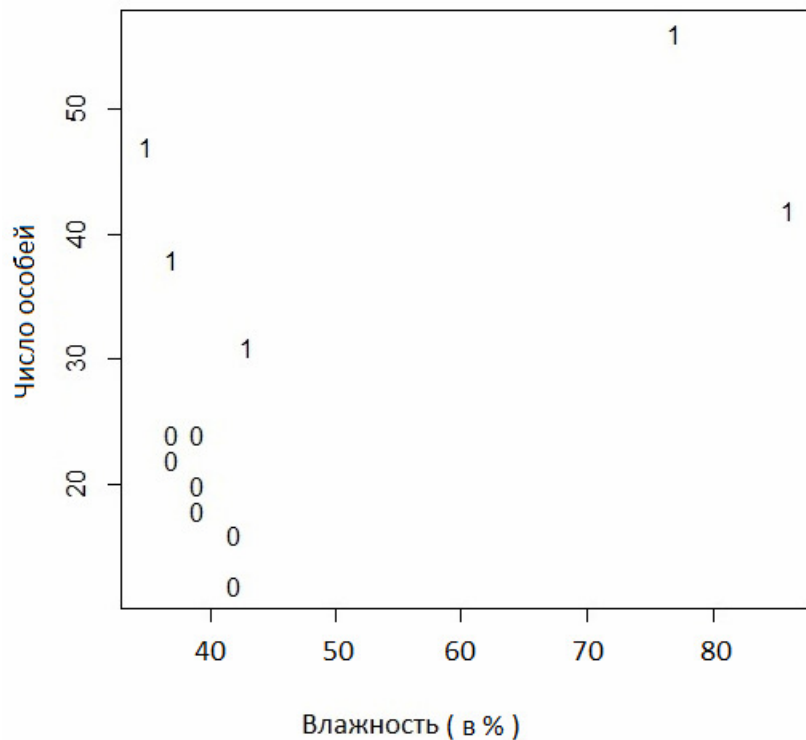


Рис. 11. Зависимость числа зарегистрированных во время учетов сеголеток от влажности воздуха, учитывая наличие дождя

1 — был дождь
0 — не было дождя

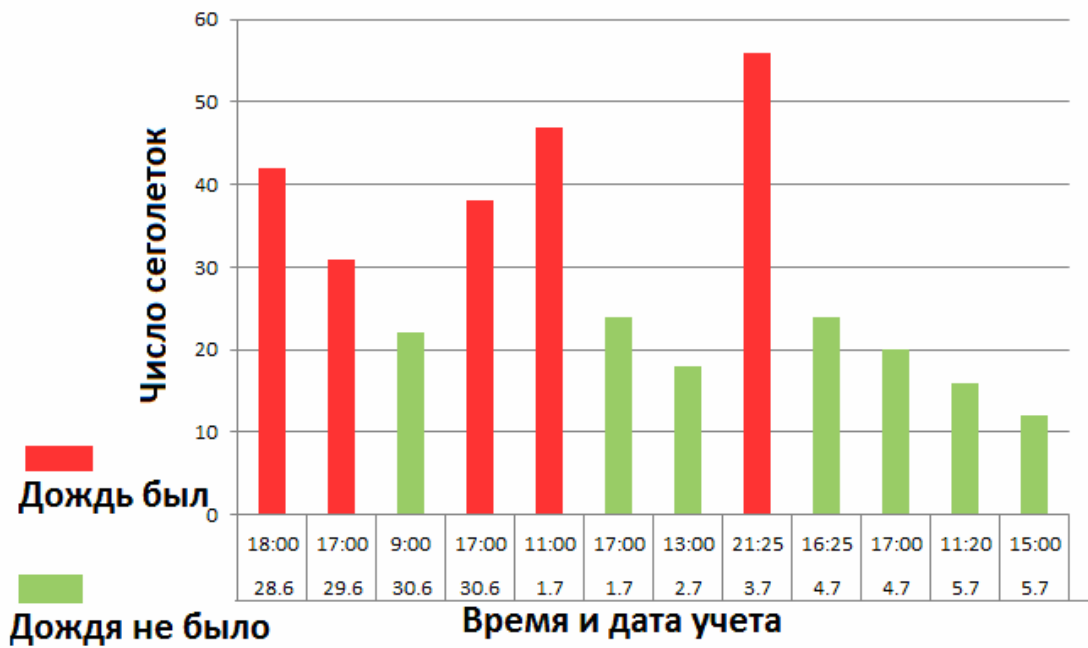


Рис. 2. Число зарегистрированных во время учетов сеголеток и наличие дождя

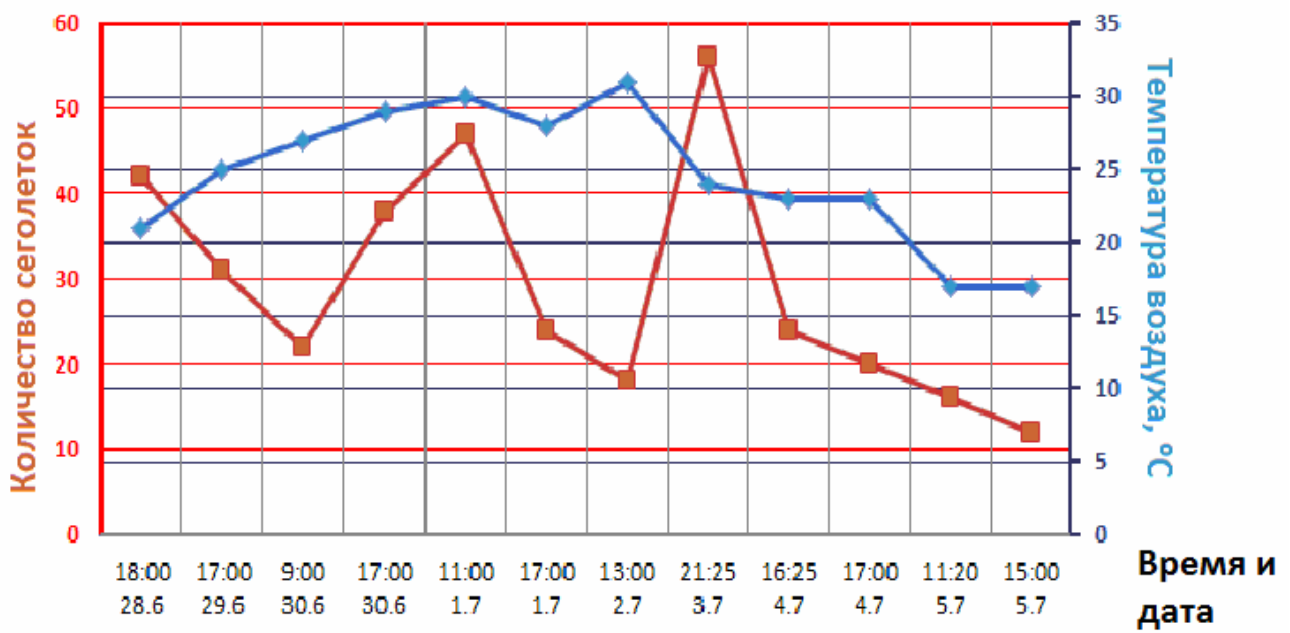


Рис. 12. Изменение числа активных сеголеток и температуры воздуха

Обсуждение

В наших опытах на запах родного водоема подтвердилось, что сеголетки травяной лягушки на стадии, называемой нами “бесхвостой”, предпочитают запах родного водоема (табл. 2), а точнее, находясь на стадии накопления, стремятся держаться возле него (Огурцов, 2012). Возможно, это происходит потому, что метаморфоз сеголеток, тестированных нами, еще не дошел до той стадии, когда они готовы расселяться. Или же сеголетки ждали подходящих погодных условий, чтобы выйти на сушу (но это маловероятно, поскольку за время наших учетов были зафиксированы весьма разнообразные условия). “Хвостатые” не проявляют однозначной реакции на запах воды родного водоема (рис. 6). Но можно сказать о всех сеголетках, что если они идут к стимулу, то идут непосредственно в отсек со стимулом, а не просто в его сторону (тогда было бы больше случаев, где в предмаркерном отсеке кто-то есть, прил. 2, 3).

В тестах на группирование сеголетки точно не идут в противоположный стимулу (их сородичам) отсек (рис. 7). Мы предполагаем, что, скорее всего, тестированные сеголетки находились с стадии накопления, а на этой стадии они держатся вместе в одной зоне близ водоема.

С помощью тестов на влажность мы показали, что хвостатые сеголетки отвергают воду и стремятся в зону с пониженной влажностью (рис. 8), а бесхвостым сеголеткам влажность воздуха безразлична. Это противоречит выдвинутой гипотезе, “хвостатым” сеголеткам невыгодно держаться в зоне пониженной влажности, поскольку не все системы их организма приспособлены к жизни на суше; бесхвостым же необходимо держаться далеко от глубокой воды, поскольку они уже утратили хорошо функционирующие жабры и могут утонуть. Возможно, такие результаты у хвостатых сеголеток можно объяснить тем, что опыты на влажность мы проводили преимущественно вечером. Известно, что травяная лягушка активнее в вечерние и утренние сумерки (Кузьмин С. Л., 2012), т.е. тестируемые в вечернее время сеголетки обычно могли отходить дальше от водоема, чем они находятся днем. Бесхвостые сеголетки же, скорее всего, находились на стадии накопления, но из-за того, что наш водоем был частично покрыт настилем из сухой травы, и они могли по ней передвигаться, не попадая в воду, зоны накопления как таковой не было. Таким образом бесхвостые сеголетки могли предпочитать находиться в более влажной среде – буквально над водой.

По результатам наших учетов, число активных сеголеток в водоеме действительно напрямую зависит от наличия дождя, то есть во время дождя мы отмечали больше сеголеток, чем во время учетов, когда его не было (рис. 11, 2). При этом нет большой разницы между числом сеголеток до дождя и после (рис. 2). Однако мы не учитывали отдельно количество активных сеголеток, находящихся на разных стадиях развития, а значит не можем сделать вывод о том, что во время дождя никакие сеголетки не покидали водоем, так как можем говорить только об изменении активности всех сеголеток относительно дождя. Это значит, что они либо все еще накапливались по берегу водоема, либо основная часть уже вышла, а в водоеме остались сеголетки на разных стадиях развития.

Выводы

1. Хвостатые сеголетки индифферентны к запаху воды из родного водоема, бесхвостые же к нему стремятся.
2. Хвостатые сеголетки стремятся в зону с пониженной влажностью, бесхвостые же – с повышенной.
3. У бесхвостых сеголеток нет выраженного стремления к себе подобным.
4. Число активных сеголеток в водоеме выше во время дождя и не зависит от температуры и влажности воздуха.

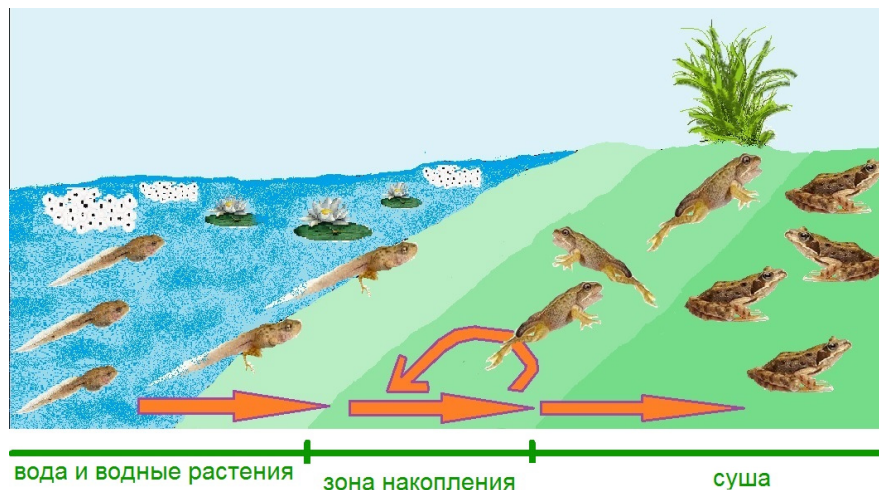
Литература

- Бастаков В. А.*, 1992. Экспериментальное исследование запоминания запаха водоёма в процессе личиночного развития у двух видов *Anura* // Зоологический журнал, Т.71, вып. 10, с. 123-127.
- Грубман М.А. и др.*, 2006. Влияние условий содержания на характер реакции сеголеток травяной лягушки *Rana temporaria* на запах родного водоёма // Флора и фауна западного Подмосковья, вып. 4, с. 65-77
- Кузьмин С. Л.*, 2012. Земноводные бывшего СССР. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2-е изд. с. 178, с. 370.
- Никитина Е.*, 2016. Жизненный цикл и стадии развития лягушек [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://fb.ru/article/251097/jiznennyiy-tsikl-i-stadii-razvitiya-lyagushek>. Дата обновления: 8.06.2016.
- Огурцов С. В.*, 2004. Запоминание запаха родного водоёма как один из механизмов хемосенсорной ориентации бесхвостых амфибий. Автореф. дис. на соискание учёной степени канд. биол. наук.
- Огурцов С. В.*, 2012. Проблема многофакторности при изучении хемоориентации сеголеток сухопутных видов амфибий // Зоологический журнал, Т.91, вып. 11, с. 1330-1339.
- Hepper P. G., Waldman B.*, 1992. Embryonic olfactory learning in frogs // Quarterly Journal of Experimental Psychology, sec.B Comparative and Physiological Psychology, V.44B, №3-4, p.179—197.
- R Core Team*, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Благодарности

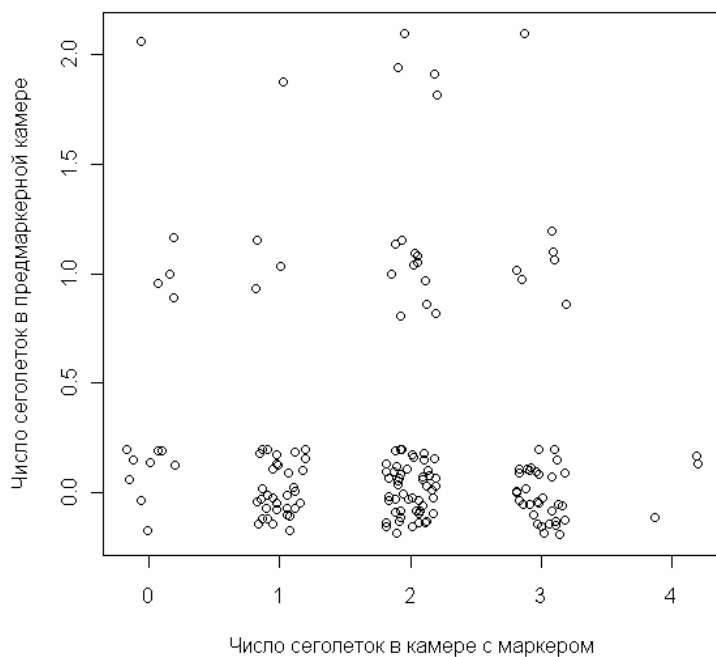
Мы благодарим С.В. Огурцова и А. Головлева за помощь в сборе данных, проведении учетов и опытов. П.А. Волкову за помощь при написании работы и обработке данных. Выражаем благодарность руководителю летней практики МГУ И.Ю. Сергееву за предоставление возможности работать на ЗБС, а также С.М. Глаголеву за организацию практики и предоставление возможности сделать научную работу.

Приложения



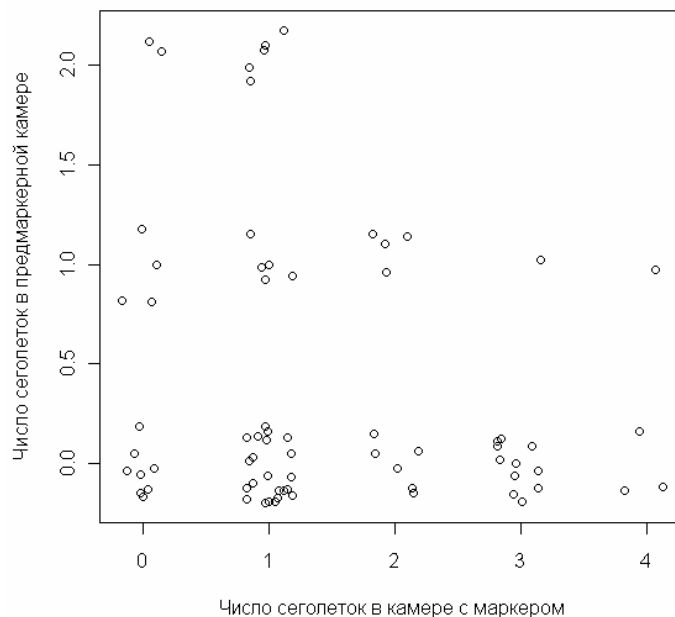
Прил. 1. Схема перемещений сеголеток вблизи родного водоема.

Бесхвостые сеголетки



Прил. 2. Число бесхвостых сеголеток в маркерном (со стимулом) и предмаркерном отсеках за все наблюдения

Хвостатые сеголетки



Прил. 3. Число хвостатых сеголеток в маркерном (со стимулом) и предмаркерном отсеках за все наблюдения