

Огурцов Сергей Викторович

**Запоминание запаха родного водоёма
как один из механизмов
хемосенсорной ориентации бесхвостых амфибий**

Специальность 03.00.08 – зоология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Электронная версия

Москва
2004

Работа выполнена на кафедре зоологии позвоночных Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова и в лаборатории обработки сенсорной информации Института проблем передачи информации РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук
кандидат биологических наук

Б.Д.Васильев
В.А.Бастаков

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
доктор биологических наук

Н.Г.Бибиков
З.А.Зорина

Ведущая организация:

Зоологический институт РАН

Защита состоится 6 декабря 2004 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д501.001.20 в Московском государственном университете им. М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, д.1, к.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан 6 ноября 2004 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

Л.И.Барсова

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Пространственная ориентация животных - одна из наиболее интересных биологических проблем. Многие механизмы ориентации до сих пор остаются загадкой. Одна из них - привязанность лягушек и жаб к своим нерестовым водоёмам. Из года в год они возвращаются на нерест в один и тот же водоём. Как формируется такая привязанность, и чем руководствуются амфибии в выборе места для размножения, в настоящее время не совсем понятно. Есть основания полагать, что бесхвостые амфибии возвращаются на нерест в родной водоём (Blair, 1953, Breden, 1987, Хмелевская, 1989). Чтобы через 2-3 года после метаморфоза по достижении половой зрелости вернуться в родной водоём для размножения, животные должны запомнить различные ориентиры этого водоёма в раннем возрасте. Обонятельные стимулы, в том числе запах родного водоёма, могут быть одними из таких ориентиров (Grubb, 1973b, Бастаков, 1991).

Зарубежные исследователи изучают запоминание амфибиями химических стимулов в контексте распознавания родственников - особей из одной кладки (Waldman, 1981, 1985, Blaustein, O'Hara, 1986). Однако для изученных видов лягушек и жаб распознавание родственников в постметаморфозный период не имеет адаптивного значения (Pfennig, 1990). В.А.Бастаков впервые показал, что химические стимулы из родного водоёма, запомненные в ходе личиночного развития, могут использоваться взрослыми амфибиями в ориентации около родного водоёма (Бастаков, 1986, 1992). С этой точки зрения, запоминание химических стимулов приобретает для амфибий адаптивное значение как один из механизмов хемосенсорной ориентации, контролирующей привязанность амфибий к родному водоёму. Возникает два вопроса. Первый: как происходит запоминание стимулов в ходе личиночного развития, т.е в какой период, насколько быстро, какой тип обучения имеет место? Второй: насколько долго может сохраняться память о знакомых стимулах, и могут ли амфибии руководствоваться ими при возвращении на нерест в родной водоём? Эти вопросы необычайно важны для понимания биологии бесхвостых амфибий, но до настоящего времени они оставались неисследованными.

Существующие методические подходы для изучения хемосенсорной ориентации взрослых бесхвостых амфибий представляют собой пёстрый набор трудно сопоставимых друг с другом методов (Grubb, 1973, 1975, Blaustein et al., 1984, Бастаков, 1986, Herper, Waldman, 1992, Reshetnikov, 1996). Поэтому в процессе работы возникла также необходимость классифицировать эти методы и выделить наиболее адекватные подходы.

Цель работы и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлось

изучение запоминания и последующего распознавания запаха родного водоёма бесхвостыми амфибиями. Основные задачи:

1. Как реагируют сеголетки на естественные источники запаха родного водоёма? В частности, отличают ли они воду из родного водоёма от воды из чужого водоёма?
2. Когда происходит запоминание запаха родного водоёма?
3. Как меняется реакция на запах родного водоёма в онтогенезе?
4. Существуют ли различия в реакции на запах родного водоёма у разных экологических групп амфибий?
5. На основе анализа существующих методик выделить наиболее адекватные подходы для исследования хемосенсорной ориентации взрослых бесхвостых амфибий.

Научная новизна. Впервые запоминание и последующее распознавание химических стимулов у бесхвостых амфибий исследованы в ходе длительного периода онтогенеза: от вылупления из икринных оболочек до полового созревания. В результате появились основания предполагать наличие в личиночном развитии амфибий не одного, как считали раньше, а двух, разделённых паузой, «чувствительных» периода запечатления химических стимулов. Также впервые данные поведенческих экспериментов по запоминанию амфибиями химических стимулов сопоставлены с данными о ходе морфологического развития обонятельного анализатора. Выяснилось, что «чувствительные» периоды запечатления стимулов приурочены к этапам активного нейrogenеза в обонятельном анализаторе. Оригинальной идеей является попытка сравнить процесс запоминания химических стимулов у амфибий с явлением импринтинга на химические стимулы, встречающегося во многих группах позвоночных животных.

Подтверждена гипотеза о существовании у бесхвостых амфибий избирательной реакции на разные концентрации знакомого химического стимула (Бастаков, 1992). Уменьшение концентрации стимула вызывает приближение сеголеток к источнику запаха.

Показано, что реакция на знакомый химический стимул меняется со временем согласно этапам жизненного цикла вида.

Практическая значимость. Предложены практические рекомендации для проведения экспериментов по исследованию хемосенсорной ориентации взрослых бесхвостых амфибий. В частности обосновано применение достаточно эффективного метода группового длительного тестирования сеголеток.

Обнаруженная у амфибий корреляция между периодами запечатления химических стимулов и этапами интенсивного морфологического развития обонятельного анализатора открывает новые возможности для проведения дальнейших исследований в области изучения

механизмов памяти.

Изучение процесса запечатления запаха родного водоёма как одного из механизмов привязанности амфибий к определённому участку местности, имеет ценность с точки зрения сохранения редких видов амфибий в природе. В Европе известны попытки интродуцировать взрослых амфибий в новые местообитания, оканчивавшиеся неудачей. Исходя из наших данных, наиболее целесообразно переселять в новые местообитания не взрослых особей, а личинок не позднее определённых стадий развития.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в виде устных докладов на 3 международных и 1 российской конференциях: «Chemical Signals in Vertebrates IX» (Krakow, Poland, 2000), «Совместная конференция Герпетологического общества им. А.М.Никольского и Общества охраны амфибий и рептилий» (Пушино, 2000), «XXVII International Ethological Conference» (Tübingen, Germany, 2001) и «12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica» (С.-Петербург, 2003). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на семинарах: Лаборатории обработки информации в сенсорных системах ИППИ РАН (1998, 1999), Лаборатории сравнительной нейробиологии позвоночных (2000), Группы химической коммуникации и хеморецепции ИПЭЭ РАН (2001, 2004) и кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ (2001, 2002).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ и 4 находятся в печати.

Структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 337 страницах, иллюстрирована 74 рисунками и 83 таблицами. Список цитируемой литературы включает 274 источника, из них 184 на иностранных языках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Привязанность к водоёму служит у бесхвостых амфибий стратегией выживания вида. У амфибий существует привязанность к родному водоёму, как месту рождения, где они прошли своё личиночное развитие. Имеются данные о возвращении на нерест в родной водоём для представителей родов *Rana* и *Bufo* (Blair, 1953, Breden, 1987, Хмелевская, 1989, Sinsch, 1997b, Rough et al., 2001). Механизм образования связей с местом рождения сравнивается с «импринтингом территории» у птиц (Соколов, 1991). Возможно, что запечатлённые в раннем онтогенезе ориентиры направляют половозрелых особей в родной водоём для размножения (Grubb, 1973b). Использование лягушками и жабами обонятельных стимулов в ориентации на

местности в настоящее время не вызывает сомнений (Васильев, 1967, Grubb, 1973c, Лукьянов и др., 1985, Sinsch, 1992b). Поэтому запах родного водоёма может быть одним из таких ориентиров.

Существуют две стратегии поведения сеголеток амфибий. Сеголетки полуводных видов длительное время не покидают окрестностей родного водоёма. У сеголеток сухопутных видов после метаморфоза, наоборот, происходит быстрое и массовое расселение от него. Эти особенности биологии определяют отношение сеголеток к запаху родного водоёма. Сеголетки прудовой лягушки *R. lessonae*, ведущие полуводный образ жизни, сразу после метаморфоза привлекаются запахом родного водоёма, а сеголетки сухопутных видов, травяной лягушки *R. temporaria* и серой жабы *B. bufo*, отвергают этот стимул (Бастаков, 1986; 1991; 1992).

Предлагается гипотеза, что запоминание запаха родного водоёма происходит у бесхвостых амфибий в ходе двух «чувствительных» периодов. Первый имеет место до начала активного питания личинок (Waldman, 1985, Pfennig, 1990, Hepper, Waldman, 1992), второй, возможно, приурочен к метаморфозу (Waldman, 1981, 1991, Бастаков, 1992). Тот факт, что запоминание химических стимулов личинками амфибий происходит в ходе ограниченного периода развития, и что память об этих стимулах сохраняется длительное время, позволяет предполагать, что данное явление аналогично импринтингу (Waldman, 1991). Импринтинг химических стимулов окружающей среды в раннем онтогенезе, по-видимому, можно считать общей чертой позвоночных животных (Hasler, Scholz, 1978, Hepper, Waldman, 1992, Grassman, 1993, Hudson, 1999, Schaal et al., 2000).

К наиболее важным критериям импринтинга относят: (1) наличие в индивидуальном развитии «чувствительного» периода, (2) в обучении нет заметного внешнего подкрепления, (3) необратимость обучения, т.е. переобучение затруднено или невозможно, (4) длительное хранение информации в памяти (Понугаева, 1973, Соколов, 1991). Привязанность к «объекту» часто дублируется двумя последовательно идущими процессами запечатления. На каждом из двух этапов запечатление может быть направлено на разные стимулы, но в естественных условиях исходящие от одного и того же «объекта» (Hudson, 1999, Djieto-Lordon, Dejean, 1999). По-видимому, рамки «чувствительного» периода задаются ходом морфологического развития анализатора (Apfelbach, Weiler, 1985, Nevitt et al., 1994, Hudson, 1999).

Трудности изучения ориентации взрослых бесхвостых амфибий заключаются в том, что амфибии склонны к длительному затаиванию, и в течение теста реакцию на стимул проявляют только около половины особей в группе. Поэтому многие исследователи

используют методику группового тестирования (Gorman, Ferguson, 1970, Taylor, Ferguson, 1970, Dole, 1972, Grubb, 1973a,c, Sinsch, 1987, 1992, Joly, Miaud, 1993). Исходя из факта, что выбор стимула у амфибий носит вероятностный характер (не в каждом опыте особь проявляет свои предпочтения), в работе выбор животным стимула рассматривается в рамках модели ориентационного поведения (Белькович, 2001).

Методики с парным предъявлением химических стимулов, применяющиеся для изучения поведения амфибий, классифицируются на 3 группы: метод учёта первого выбора, метод учёта времени пребывания, метод повторных наблюдений. Метод учёта первого выбора практически не используется в современных исследованиях на взрослых амфибиях, ведущих наземный образ жизни. Вместо этого часто проводят повторные наблюдения за положением животного в течение длительного теста, чтобы охарактеризовать его перемещения как неслучайные (Lee, Waldman, 2002, Sullivan et al., 2002; Gautier et al., 2004). Однако метод повторных наблюдений требует более сложной и аккуратной статистической обработки, одним из вариантов которой является сравнение опытных данных с моделью случайного процесса (Тихонов, Уфимцев, 1988, Gotelli, 2000).

ГЛАВА 2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования, процедура тестирования и статистическая обработка.

Работа проводилась в 1997-2004 гг. на 5 видах бесхвостых амфибий: прудовая лягушка *Rana lessonae* Cam., озёрная лягушка *R. ridibunda* Pall., травяная лягушка *R. temporaria* L., серая жаба *Bufo bufo* L., зелёная жаба *B. viridis* Laur. Прудовая и озёрная лягушки - представители группы полуводных видов. Травяная лягушка, серая и зелёная жабы относятся к группе сухопутных видов. Для того, чтобы выяснить, способны ли представители перечисленных видов распознавать интересующие нас химические стимулы, их тестировали в условиях парного выбора стимулов в тест-камере и Т-образном лабиринте как природных, так и выращенных в лаборатории сеголеток. Чтобы определить наиболее адекватные подходы в решении данной задачи проводили индивидуальные и групповые тесты, как по методу учета первого выбора, так и по методу длительного тестирования. Большая часть материала получена методом группового тестирования и преимущественно касается изучения поведения прудовой лягушки. Всего протестировали: 558 сеголеток *R. lessonae* (25 групп, 182 групповых и 7 индивидуальных тестов), 16 *R. ridibunda* (1 группа, 1 групп. тест), 1335 *R. temporaria* (48 групп, 50 групп. и 2 инд. теста), 1097 *B. viridis* (43 группы, 55 групп. и 7 инд. тестов) и 225 особей *B. bufo* (6 групп, 6 групп. тестов). Икру и сеголеток *R. lessonae* брали в прудах у д.Каверино Ступинского р-на и в окрестностях биостанции «Глубокое озеро»

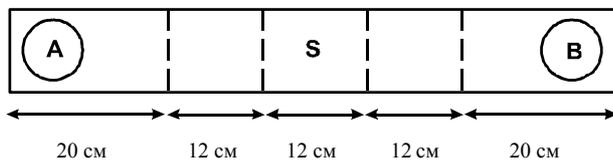


Рис. 1. Схема тест-камеры, вид сверху.

A и B – чаши Петри с химическими стимулами, S – стартовая позиция сеголеток.

Рузского р-на Московской области. Сеголеток *R. ridibunda* - в водоёме у Михайловского кордона национального парка «Орловское полесье» Орловской области. Икру *R. temporaria* - в водоёмах у д.Каверино, а сеголеток - в водоёмах из окрестностей Звенигородской биологической станции (ЗБС) МГУ (Одинцовский р-н Московской области). Сеголеток *V. bifo* - в «Стерляжьем пруду», на территории ЗБС. Сеголеток *V. viridis* - в водоёме на юго-западе г.Москвы у Дворца творчества детей и юношества, в водоёме у д.Луцино, в пруду у

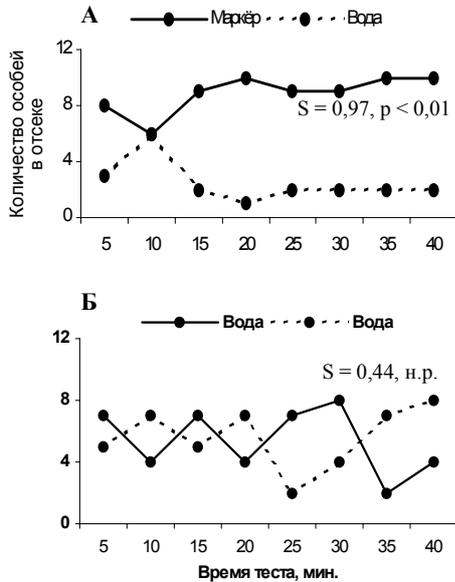


Рис. 2. Типы реакции на химический стимул.

А - реакция предпочтения знакомого маркера (смеси знакомой прудовой воды и крапивы) в сравнении с незнакомой прудовой водой (вода) в группе сеголеток прудовой лягушки из 12 особей. Б - индифферентная реакция на предъявление двух одинаковых стимулов (дехлорированной водопроводной воды) в той же группе. Показана динамика распределения сеголеток по парам крайних отсеков. Приведены показатель стабильности S для пары отсеков с маркером и достоверность отличия данного распределения от случайного равномерного распределения (н.р. – нет различий).

железнодорожного переезда у д.Шихово и в Шараповском карьере у д.Шарапово Одинцовского р-на Московской области.

В Т-лабиринте сеголеток тестировали по методике учета первого выбора (Бастаков, 1986), но животных высаживали в старт-камеру группой по 3 особи. Большую часть тестов проводили в пластиковой камере длиной 76 см, шириной 12 см и высотой 15 см, разделенной на 5 отсеков вертикальными перегородками высотой 5 мм (рис. 1). Съёмный потолок из прозрачного органического стекла имел вентиляционные отверстия на дальних концах. Тесты ставили в тёмное время суток. Камеру освещали сбоку лампой накаливания

мощностью 40 Вт с расстояния 40 см от середины одной из длинных стенок камеры. Источники запахов находились в чашках Петри с двух сторон в торцах тест-камеры в виде водных растворов объёмом 20 мл. В одном конце тест-камеры предлагали знакомый химический стимул, в другом – дехлорированную водопроводную воду или источник незнакомого запаха. После каждого теста камеру промывали водой.

При групповом тестировании каждую опытную или контрольную группу делили на 2 или 4 подгруппы примерно равного размера по 3-12 особей. Каждую подгруппу тестировали отдельно. Всех сеголеток подгруппы помещали одновременно в середину тест-камеры под непрозрачный колпак, и через 5 секунд колпак убирала. Далее каждый тест длился 40 мин., в течение которых через 5 мин. интервалы подсчитывали количество сеголеток, находящихся в разных отсеках камеры. Положение стимулов (справа-слева) в тест-камере изменяли для каждой следующей подгруппы, чтобы исключить влияние выбора правого или левого отсека на анализ результата. В индивидуальных тестах каждую сеголетку тестировали в камере отдельно. Так же, как при тестировании группы, сеголетку выпускали в середину тест-камеры и в течение 40 мин. через 5 мин. интервалы регистрировали положение сеголетки в отсеках камеры. Для каждой следующей сеголетки положение стимулов (справа-слева) меняли.

Выбранная продолжительность теста 40 мин. соответствует продолжительности периода наиболее стабильного распределения сеголеток в тест-камере в ответ на предлагаемый стимул или, другими словами, времени, в течение которого сохраняется различимый подопытными градиент запаха. Из анализа индивидуальных траекторий движения особей при групповых тестах следует, что 5 мин. интервал учета положения сеголеток в отсеках не создает предвзятой периодичности в результатах.

Выбор стимула сеголетками в тест-камере оценивали по динамике распределения особей по противоположным отсекам. Для характеристики стабильности распределения сеголеток в тест-камере в ответ на предлагаемый стимул, надо выяснить, насколько долго сохраняется асимметрия в соотношении числа особей, находящихся в двух противоположных (крайних) отсеках, в течение теста? Для описания такой особенности временного ряда единым числом мы ввели индекс - показатель стабильности распределения (S). Два ряда сопряжённых значений - количество особей, находящихся в двух противоположных отсеках, пересчитываются в один ряд разностей этих значений. Каждая разность имеет абсолютное значение и знак. Чтобы оценить вклад разностей каждого знака, разности ранжируются по абсолютному значению, включая нулевые разности. Затем отдельно для положительных и отрицательных разностей высчитывается сумма рангов. Доля, которую составляет сумма

рангов разностей одного знака от общей суммы рангов, и есть показатель стабильности распределения (S). Он изменяется от 0 до 1. Чем чаще особи находятся в данном крайнем отсеке и, чем больше разница в количестве особей, находящихся в данном отсеке, чем в противоположном, тем больше доля положительных разностей - больше значение S для данного крайнего отсека. Если же будет иметь высокое значение доля (S) для отрицательных разностей, это будет свидетельствовать о стремлении животных «избегать» данный отсек. Аналогично можно вычислить показатель стабильности распределения S для серии повторных тестов в Т-лабиринте.

Чтобы достоверно оценить постоянство смещения распределения сеголеток в сторону одного из стимулов (одного из крайних отсеков) необходимо сравнить полученное в опыте значение показателя S с его значением, рассчитанным для «случайного блуждания» тех же особей в тест-камере. «Случайное блуждание» подразумевает отсутствие упорядочения в распределении сеголеток по отсекам во времени. Для расчета показателя S для «случайного блуждания» нами используется модель случайного процесса, основанная на методе Монте-Карло (Тихонов, Уфимцев, 1988). Модель строится по классической схеме (Gotelli, 2000). В модели сохраняются значения следующих параметров, взятых из опыта. Во-первых, размер тестируемой группы. Во-вторых, средняя доля регистраций сеголеток в крайних отсеках камеры (или в крайних парах отсеков) от общего числа регистраций во всех отсеках (рассчитывается как медиана по 8 повторным наблюдениям). В модели «случайного блуждания» исходят из положения, что каждая особь одинаково вероятно посещает противоположные отсеки камеры, при этом общая доля посещения крайних отсеков берется из опыта. Модель предусматривает ещё два условия. Во-первых, предполагается, что особи перемещаются независимо друг от друга. (При анализе видеосъемки групповых тестов прудовой лягушки не обнаружено ни следования особей друг за другом, ни тенденции перемещаться скоплениями. Нахождение большей части группы в одном из крайних отсеков не сдвигает распределения особей в свою сторону. Этой проблеме посвящена отдельная серия опытов в работе.) Во-вторых, за время между последовательными наблюдениями особи должны быть потенциально способны оказаться в любом из отсеков тест-камеры. Действительно, средняя скорость перемещения особей составляет 4-5 переходов из отсека в отсек за 5 мин.

Зная с какой вероятностью особи посещают крайние отсеки в опыте, для каждой сеголетки можно сгенерировать гипотетический ряд из 8 чисел, которые будут моделировать последовательность номеров посещаемых отсеков (отсеки тест-камеры нумеруются от 1 до 5). Для N сеголеток группы получится N таких рядов чисел, исходя из которых

рассчитывается показатель стабильности S для одного из крайних отсеков со стимулом. Повторив такую процедуру 100000 раз, получают распределение случайных значений показателя стабильности S . Проверяется односторонняя нулевая гипотеза: вычисленный в опыте показатель стабильности для отсека со стимулом не превосходит случайного значения показателя. Для уровня значимости 0,05 рассчитывают границу, ниже которой находятся 95% случайных значений (95% процентиль). В работе приводится таблица полученных таким образом критических значений. Если полученный в опыте показатель S для крайнего отсека со стимулом (доля положительных разностей) будет превышать табличное значение, это значит, что распределение сеголеток по противоположным отсекам камеры, в ходе теста постоянно было смещено в сторону этого отсека с достоверностью $p < 0,05$. Аналогично создается модель «случайного выбора» для повторных опытов в Т-образном лабиринте.

В работе выделяли 3 типа реакции группы особей на стимул: реакцию предпочтения, реакцию отвергания и индифферентную реакцию. Реакция предпочтения стимула заключается в том, что распределение сеголеток в тест-камере сдвигается ближе к интересующему нас химическому маркеру и поддерживается таким в ходе большей части теста (рис. 2, А). Реакция отвергания заключается в постоянном смещении распределения сеголеток в сторону, противоположную положению химического маркера. Индифферентная реакция на стимул характеризуется тем, что перемещения сеголеток по противоположным отсекам носят хаотичный или случайный характер (рис. 2, Б). Характер усредненного распределения по отсекам (уни- или бимодальность распределения, доля посещения крайних отсеков) меняется у разных групп и в разных тестах, но упорядоченность перемещений особей во времени является постоянной характеристикой для предъявляемого стимула и служит основным показателем реакции группы на него.

Данные индивидуальных тестов статистически обрабатывали, во-первых, с помощью критерия Вилкоксона для сопряжённых пар (анализ на популяционном уровне). Во-вторых, для каждой особи вычисляли показатель S , чтобы оценить достоверность выбора стимула на индивидуальном уровне. Этот метод позволяет оценить процентное соотношение предпочитающих, отвергающих и индифферентно реагирующих на стимул особей в группе.

Все вычисления критических значений проводили в программном пакете анализа данных MS Excel 2000. На основе макросов в MS Excel была сделана программа автоматической обработки результатов теста (автоматическое построение однотипных графиков, вычисление показателя S и достоверность отличия распределения от случайного). Вычисление достоверности различий по критерию Вилкоксона для сопряжённых пар и по U-критерию Манн-Уитни проводили в программе STATISTICA 6.0. В этой же программе

вычисляли коэффициент корреляции Спирмена R и его достоверность.

2.2. Экспозиция в химических стимулах в ходе эмбрионального и личиночного развития. Чтобы выявить в личиночном развитии период запоминания химических стимулов, проводили эксперименты с выращиванием сеголеток в лабораторных условиях. Головастики выращивали в химически маркированной среде. В определённый период эмбрионального и личиночного развития им в воду добавляли один из следующих химических маркёров: морфолин, β -фенилэтанол или смесь этих веществ. Естественным маркёром служила прудовая вода. В эмбриональном и личиночном развитии выделяли 4 периода, когда в воду добавляли маркёр: (1) до вылупления из икринных оболочек (стадии 0-27(30), по: Дабагян, Слепцова, 1975), (2) период от вылупления до начала активного питания личинок (стадии 27(30)-34(38)), (3) середина личиночного развития до начала дифференцировки почек задних конечностей (стадии 39-42(43)), (4) позднее личиночное развитие до начала укорочения хвоста (стадии 42(47)-52). С началом активного питания личинок в воду добавляли также корм в виде варёной свежей крапивы. Добавление химического маркёра и корма, а также замену воды производили через 1-2 дня. Контролем служили сеголетки, также выращенные в лабораторных условиях, но никогда не контактировавшие в личиночном развитии с указанными химическими маркёрами. Контрольных животных тестировали на те же пары стимулов, что и опытных сеголеток. Морфолин применяли в концентрации: в ходе экспозиции личинок - 10^{-7} моль/л, при тестировании сеголеток - 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} моль/л. Фенилэтанол применяли в концентрации: в ходе экспозиции личинок - 10^{-7} и 10^{-8} моль/л, при тестировании сеголеток - 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} моль/л. В отдельных тестах предлагали также смесь химического маркёра со знакомым кормом (комплексный стимул).

2.3. Исследование динамики реакции на запах родного водоёма. Чтобы понять, какими факторами определяется динамика реакции на запах родного водоема в онтогенезе, отлавливаемых сеголеток делили на группы по определенным показателям, а затем сравнивали у этих групп характер реакции на предлагаемые стимулы. Выделяли следующие этапы жизненного цикла. У сеголеток: (1) период, когда они держатся около родного водоёма, (2) начало расселения, уход от водоёма. Однолетних особей (активно расселяющихся) не подразделяли. У взрослых двухлетних особей: (1) весенний период (начало размножения), (2) летний период (нагульный период). На каждом из указанных этапов жизненного цикла тестирование той или иной группы на знакомый химический маркёр повторяли.

Сеголеток прудовой лягушки тестировали первый раз до начала периода расселения от

водоёма. В период расселения их тестировали повторно. При тестировании травяной лягушки, серой жабы и зелёной жабы сеголеток разделяли на пойманных до и после начала массового расселения от водоёма, по наличию рудиментов хвоста на хвостатых и бесхвостых, а также по расстоянию от водоёма, на котором были отловлены сеголетки. Чтобы сопоставить динамику реакции на запах родного водоёма с динамикой расселения от водоёма, проводили учёты сеголеток на учётной площадке 1x1 м у кромки воды и на кольцевой учётной тропинке по периметру водоёма в 1,5-6 м от кромки воды 3-4 раза в день. Дату резкого спада максимального за день количества сеголеток на учётной тропинке принимали за начало массового расселения от водоёма.

Чтобы проверить, запоминают ли сеголетки химические стимулы после метаморфоза, одну из групп сеголеток прудовой лягушки содержали в течение 22 дней в террариуме, где в воду добавляли химический маркёр (фенилэтанол, 10^{-7} моль/л). Сеголеток тестировали на распознавание химического маркёра на 12-й и 22-й день экспозиции, а также через 8 дней после окончания экспозиции в маркёре. Сходные опыты провели с зелёной жабой. Одна группа сеголеток была переселена из родного водоёма в новый незнакомый для них водоём, и через 5 дней сеголеток протестировали на способность узнавать запах воды пруда, к которому их переселили. Другую группу сеголеток посадили в террариум, где в воду добавляли химический маркёр (морфолин, 10^{-7} моль/л). Через 4 дня эту группу протестировали на отношение к этому маркёру. Контролем служила группа сеголеток, просидевших 4 дня в террариуме, но без добавления маркёра в воду.

Существует гипотеза, что у взрослых амфибий реакция предпочтения запаха родного водоёма контролируется секрецией гонадотропных гормонов (Grubb, 1973). Чтобы это проверить, двухлетним особям прудовой лягушки (длина тела около 40 мм, вес 5-9 г) вводили подкожно в бедренные лимфатические мешки по 50 ЕД хорионического гонадотропина в 0,05 мл изотонического раствора NaCl 0,9%. Через 4-6 часов после инъекции лягушек тестировали на распознавание знакомого химического маркёра. Попутно с этими опытами проводилось исследование морфологического развития половой системы лягушек однолетнего и двухлетнего возраста: описывали степень развития семенников, яичников, яйцеводов и жировых тел.

Проводили также учёты молодых однолетних особей (длина тела менее 4,5 см) и взрослых половозрелых особей (длина тела более 5 см) прудовой лягушки в водоёмах окрестностей д.Каверино до появления сеголеток. Учёты проводили методом визуального наблюдения или отлова сачком меченых по рисунку спины особей в дневное время. Обследуемые водоёмы разделяли на нерестовые и нагульные. В районе проведения учётов

находились 3 нерестовых и 3 нагульных водоёма, расположенных в 150-700 м друг от друга. Необходимо было выяснить, встречаются ли однолетние неполовозрелые особи в нерестовых водоёмах, т.е. в тех водоёмах, которые для части из них могут являться родными.

ГЛАВА 3. СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ТЕСТИРОВАНИЯ

Индивидуальные тесты с учетом первого выбора и индивидуальные 40 мин. тесты приводят к противоположным заключениям. Согласно первому, знакомые стимулы способна распознавать только *R. lessonae*, а согласно второму – только *B. viridis*. Оба метода оказываются неперспективными для исследования реакции у *R. temporaria*. Применение же метода группового 40 мин. тестирования показывает, что сеголетки всех трех видов

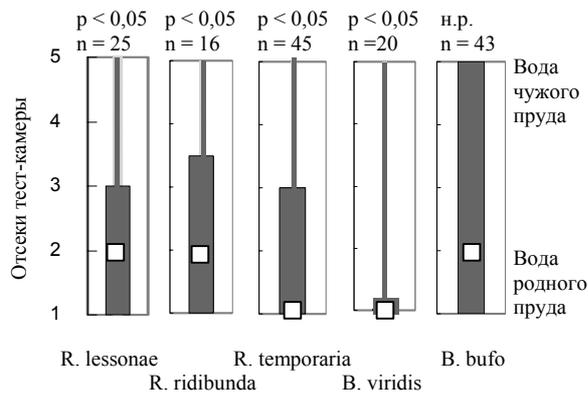


Рис. 3. Реакция на воду родного пруда у сеголеток 5 видов бесхвостых амфибий сразу после метаморфоза. Белый квадрат – медиана распределения сеголеток. Темный прямоугольник – 25% и 75% процентиля распределения. Черная линия – диапазон посещаемых отсеков. Указана достоверность отличия распределения в крайних отсеках от случайного.

способны запоминать и распознавать химические стимулы.

В индивидуальных тестах сеголетки достоверно чаще находятся в крайних отсеках тест-камеры (перемещаются резкими бросками из одного конца камеры в другой), чем в групповых тестах, и постоянно совершают вертикальные прыжки, пытаются выбраться наружу. Такое поведение можно рассматривать как беспокойное. Значит, для создания более комфортной обстановки во время опыта целесообразно тестировать сеголеток в группе себе подобных. Нахождение в группе является естественным условием для них, поскольку в период пребывания у водоема сеголетки не изолированы друг от друга.

Из индивидуальных тестов следует, что у *R. lessonae* знакомый стимул в первом выборе предпочитают 53-91%, отвергают - 9-30% особей группы. Время, проводимое хвостатыми сеголетками *B. viridis* в отсеке со знакомым стимулом, составляет около 50% времени теста. Доля особей, проводящих достоверно больше времени у знакомого стимула, равна 43%. Тех,

кто отвергает стимул - 7%. Анализ групповых и индивидуальных 40 мин. тестов с помощью F-критерия Фишера (Урбах, 1964) показал, что особи опытной группы по предпочтению стимулов очень сходны между собой, но в каждый момент времени различаются мотивацией к выбору. Поэтому по характеристике небольшой доли реагирующих в данный момент особей можно оценить реакцию группы в целом. Достаточно провести один групповой тест, дающий высокоповторяемый результат. В виду своей эффективности и однозначности интерпретации результатов для разных видов амфибий, метод группового 40 мин. тестирования выбрали для решения основных задач работы.

ГЛАВА 4. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Реакция природных сеголеток на естественные источники запаха родного водоёма. Сеголетки *R. lessonae*, *R. ridibunda*, *R. temporaria* и *B. viridis*, отловленные в естественных условиях, сразу после метаморфоза привлекаются запахом родного водоёма. Сеголетки *B. bufo* сразу после метаморфоза при сравнении воды родного пруда с водой чужого не отдают предпочтения ни одному из источников запаха (рис. 3). Запаховый образ родного водоёма у сеголеток *R. lessonae* формируют водные источники запаха (прудовая вода и водные растения), но не почва, окружающая водоём.

4.2. Запоминание химических стимулов в ходе личиночного развития

4.2.1. Прудовая лягушка, *R. lessonae*. Сеголетки *R. lessonae* относятся индифферентно к незнакомым химическим стимулам в любой из исследованных концентраций (прудовая вода, варёная крапива, морфолин, фенилэтанол, смесь морфолина и фенилэтанола). Экспозиция в химическом маркёре на стадиях 27(29)-34 приводит к его предпочтению после метаморфоза. Минимальная продолжительность экспозиции в этот период - 4 дня. Наблюдается избирательная реакция на разные концентрации знакомого стимула: концентрации равные или меньшие экспозиционной предпочитают, выше экспозиционной – отвергаются (рис. 4).

Комплексный стимул или смесь «всех» химических веществ, присутствовавших в воде в период экспозиции, оказывается более эффективным для выявления реакции сеголеток на знакомую химическую среду, чем отдельно взятые компоненты этой смеси. Учитывая влияние комплексного стимула, удаётся выявить реакцию предпочтения знакомого маркёра у сеголеток, подвергшихся экспозиции на стадиях 42(47)-48(52) (рис. 2). Продолжительность экспозиции - не менее 15 дней. На этих стадиях также формируется избирательная реакция на знакомый маркёр. Тот факт, что одни и те же сеголетки могут запомнить на стадиях 27(28)-34 один химический маркер, а на стадиях 42(43)-48(49) другой, говорит о том, что

процессы запоминания стимулов в эти периоды можно считать независимыми друг от друга.

На стадиях личиночного развития 39-42(43) и 42(47)-48(52), а также в течение всего личиночного развития на стадиях 27(28)-52, экспозиция в искусственном химическом маркёре (морфолине, фенилэтаноле) может привести к появлению у сеголеток реакции отвергания маркёра. Однако в эти периоды экспозиции реакция на отдельно взятые маркёры не может являться показательной, поскольку сеголетки дифференцированно реагируют на разные компоненты знакомой запаховой смеси. В случаях возникновения отвергания избирательной реакции на разные концентрации маркёра у таких сеголеток, не наблюдается.

4.2.2. Травяная лягушка, *R. temporaria* и зелёная жаба, *B. viridis*. Сеголетки *R. temporaria* относятся индифферентно к незнакомым химическим стимулам, морфолину и фенилэтанолю. Сеголетки *B. viridis* относятся индифферентно к незнакомому химическому стимулу, морфолину, но фенилэтанол, в концентрации 10^{-8} моль/л вызывает у них реакцию отвергания, т.е. является «неприятным» для них веществом.

Экспозиция в химическом маркёре (прудовой воде) на стадиях 0-19 эмбрионального развития у сеголеток *B. viridis* не приводит к его предпочтению после метаморфоза. Напротив, экспозиция в маркёре (морфолине) на стадиях личиночного развития 30-34 (*B. viridis*) или 30-38 (*R. temporaria*) приводит к предпочтению этого маркёра сеголетками. Минимальная продолжительность экспозиции: для *B. viridis* - 4 дня, для *R. temporaria* - 3 дня. При этом сеголетки *B. viridis* избирательно реагируют на разные концентрации этого

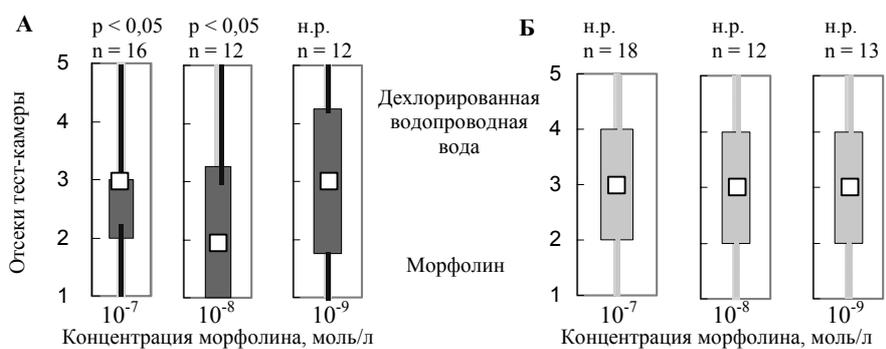


Рис. 4. Реакция сеголеток прудовой лягушки опытной (А) и контрольной (Б) групп на разные концентрации морфолина. Обозначения как на рис.3. Опытная группа подверглась экспозиции в морфолине (10^{-7} моль/л) на стадиях 28(29)-34.

стимула.

Экспозиция в таком химическом маркёре, как фенилэтанол, на стадиях личиночного

развития 30-34 (*B. viridis*) или 30-38 (*R. temporaria*) приводит к отверганию сеголетками всех предлагаемых концентраций фенолэтанола.

4.3. Динамика реакции на запах родного водоёма в онтогенезе.

4.3.1. Сеголетки прудовой лягушки *R. lessonae* и зелёной жабы *B. viridis*. Сеголетки *R. lessonae* и *B. viridis* сразу после метаморфоза проявляют реакцию предпочтения знакомого

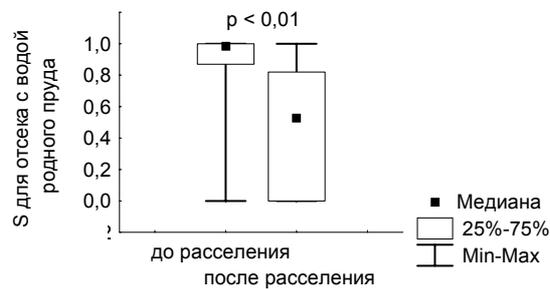


Рис. 5. Характер реакции на воду родного пруда у сеголеток травяной лягушки *R. temporaria* до (16 групп, 552 особи) и после начала расселения от водоёма (10 групп, 234 особи).

p - достоверность различий по критерию Манн-Уитни.

химического маркера. В период расселения реакция предпочтения сменяется индифферентным отношением к стимулу или даже его отверганием. По предварительным данным, у сеголеток *R. lessonae* появление индифферентной реакции на знакомый стимул в период расселения свидетельствует не о полном исчезновении реакции предпочтения стимула, а скорее о возникновении избирательной реакции на разные его концентрации: предпочтение вызывают более низкие концентрации стимула.

У природных сеголеток *R. lessonae* реакция предпочтения запаха родного водоёма сохраняется в лаборатории до 2 месяцев после метаморфоза. Это коррелирует с тем, что до начала сентября большинство сеголеток *R. lessonae* после метаморфоза находятся в пределах менее 1 метра от кромки воды. У передержанных в лаборатории сеголеток реакция сменяется индифферентностью через 2,5 месяца после метаморфоза, в конце октября. К началу октября сеголетки перестают встречаться в окрестностях родного пруда.

Сеголетки *B. viridis* могут держаться в пределах 5 м от родного водоёма не менее 1 недели после начала выхода на сушу. В течение этого периода времени (3-9 дней) предпочтение запаха родного водоёма сохраняется у природных сеголеток, передержанных в лаборатории. У *B. viridis* предпочтение проявляют сеголетки с рудиментами хвоста, что коррелирует с поведением хвостатых сеголеток: они держатся вблизи родного водоёма и при испуге спасаются бегством в родной водоём. Бесхвостые сеголетки *B. viridis* перестают при испуге спасаться бегством в сторону родного водоёма, отходят от него на большее расстояние и индифферентно относятся к запаху родного водоёма или даже отвергают его.

После метаморфоза длительный контакт сеголеток *B. viridis* (в течение 4-5 дней) и прудовой лягушки (в течение 22 дней) с естественным или искусственным химическим стимулом не формируют к нему предпочтения.

4.3.2. Сеголетки травяной лягушки *R. temporaria*. Наличие хвоста у сеголеток травяной лягушки, как показатель уровня морфологического развития и времени, прошедшего с момента выхода на сушу, не коррелирует с проявлением реакции предпочтения. Характер реакции на запах родного водоёма определяется динамикой расселения в данный сезон, которая в свою очередь зависит от погодных условий. В сухой сезон сеголетки несколько дней держатся у родного водоёма, не начинают массового расселения и при этом предпочитают запах родного водоёма. Во влажный сезон сеголетки по выходе на сушу непрерывно расселяются от родного водоёма и демонстрируют в основном либо индифферентную реакцию, либо отвергание запаха родного водоёма.

Характер реакции на запах родного водоёма, по-видимому, меняется в зависимости от того, на каком расстоянии (и, вероятно, в каких условиях влажности) находится сеголетка от родного пруда. Наиболее выраженное отвергание запаха родного водоёма проявляют сеголетки вблизи кромки воды. Те, кто находится чуть дальше на берегу в зоне влажной растительности сдвигают в опыте своё распределение в сторону предпочтения того же стимула. Возможно, на небольшом расстоянии от водоема существует зона с оптимальными для сеголеток условиями влажности, в которую они стремятся перейти и остаться там до начала расселения. Ушедшие на расстояние 1,5-3 м от водоёма (расселяющиеся) особи реакции предпочтения уже не проявляют.

4.3.3. Сеголетки серой жабы *B. bufo*. Сеголетки, находящиеся на берегу у кромки воды, проявляют индифферентное отношение к запаху родного пруда. Сеголетки серой жабы удаляются от родного водоёма, передвигаясь с продолжительными остановками, на расстояние до 30 м от кромки воды. После чего сеголетки, по-видимому, приостанавливают расселение на более дальние дистанции, и в этот период они начинают предпочитать запах родного пруда. Как у травяной лягушки, прежде чем совсем удалиться от водоема, сеголетки на некоторое время задерживаются в его ближайших окрестностях.

4.3.4. Факторы, определяющие характер реакции на запах родного водоёма у сеголеток сухопутных видов. Динамика реакции на запах родного водоёма у *R. temporaria* и *B. viridis* определяется готовностью сеголеток к расселению или их внутренними ритмами (временной фактор) и, по-видимому, какими-то внешними (погодными) факторами, служащими для синхронизации процессов расселения (рис. 5). Описано существование зоны «буферного» скопления у сеголеток сухопутных видов, на примере *B. viridis*. Сеголетки

задерживаются на расстоянии 5-20 м от водоёма, где, вероятно, завершают физиологические перестройки, связанные с переходом к сухопутному образу жизни. Такая пространственно-временная структура также отражается в характере реакции на запах родного водоёма.

Методически важно, что результаты полученные ранее на отдельных группах сеголеток (изменение предпочтений при расселении от водоема, отсутствие различий в реакции хвостатых и бесхвостых сеголеток травяной лягушки) полностью подтвердились при тестировании большого числа групп особей.

4.3.5. Однолетние особи *R. lessonae*. У большинства групп *R. lessonae* в возрасте одного года в весенний период реакция предпочтения знакомого химического маркера, проявлявшаяся после метаморфоза, сменяется индифферентным отношением к этому маркеру или его отверганием.

4.3.6. Взрослые двухлетние особи *R. lessonae*. Весной второго года жизни прудовые лягушки некоторых опытных групп проявляют реакцию предпочтения на знакомый химический маркер, в котором они подверглись экспозиции на личиночных стадиях развития. В летний период второго года жизни лягушки относятся индифферентно к знакомому маркеру. Инъекция хорионического гонадотропина изменяет реакцию на знакомый маркер с индифферентности на предпочтение или отвергание.

4.3.7. Развитие половой системы у однолетних и двухлетних особей прудовой лягушки *R. lessonae*. Наиболее резкие морфологические изменения в репродуктивной системе у прудовой лягушки происходят зимой, в декабре-феврале второго года жизни, что особенно заметно на репродуктивной системе самок. Весной второго года жизни, в апреле, некоторые лягушки уже, по-видимому, готовы к размножению. Прудовые лягушки на втором году жизни различаются по степени зрелости гонад.

4.3.8. Особенности использования пространства однолетними и взрослыми особями прудовой лягушки, *R. lessonae*. В нерестовых водоёмах, даже вне периода размножения, молодые однолетние особи прудовой лягушки обычно не появляются. Они осваивают окружающие нагульные водоёмы.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ

5.1. Выбор метода тестирования. Ввиду ряда противоречий некогда успешно начатые работы по хемосенсорной ориентации сеголеток бесхвостых амфибий, связанные с распознаванием запаха родного водоема (Бастаков, 1986, 1992), не получили дальнейшего продолжения (Reshetnikov, 1996). Мы сочли эти противоречия методическими и попытались предложить более однозначный метод исследования. Применяя комплекс методов, выяснили,

что индивидуальные тесты с учетом первого выбора и индивидуальное 40 мин. тестирование дают противоположные результаты. Предложенный в работе метод группового 40 мин. тестирования оказался более однозначным. Этот метод обнаружил как факт запоминания стимулов в ходе личиночного развития, о чем говорил метод индивидуального тестирования с учетом первого выбора, так и факт существования динамики реакции на знакомые стимулы, о чем свидетельствовал метод индивидуального 40 мин. тестирования. Выпадавшая при индивидуальном тестировании из общего контекста исследования травяная лягушка, также нашла свое место в этой концепции.

При индивидуальном тестировании сеголетки прудовой лягушки ведут себя беспокойно и в буквальном смысле мечутся по тест-камере. Возможно, мы имеем дело с изоляционным стрессом, не позволяющим особям в «одиночной камере» проявить характерное для них поведение (Sneddon et al., 1998). Известно, что нахождение в группе конспецификов позволяет сократить затраты на обследование незнакомого пространства и сокращает время ориентировочной реакции (Stamps, 2001).

Существование цикличности в двигательной активности позволяет большому числу особей амфибий существовать на ограниченном участке местности, используя его эшелонированно (Хмелевская и др., 1989, Северцов, 1993). Возможно, подобной цикличностью объясняется факт, обнаруживаемый в исследованиях подобных нашему, что особи, будучи очень сходными между собой по предпочтению стимулов, в каждый момент времени различаются мотивацией к их выбору. В силу этого обстоятельства нет необходимости в подобных работах увеличивать число подопытных животных, чтобы «вытащить» небольшую долю реагирующих особей на статистически значимый уровень. Достаточно провести один групповой тест и выявить эту небольшую долю, чтобы заключить, что большая часть оставшихся особей реагирует сходным образом. Это положение полностью подтверждается нашими данными. Во-первых, повторное групповое тестирование тех же особей приводит к тому же результату, т.е. результат неслучаен. Во-вторых, один и тот же результат получен для групп, протестированных в разные годы и из разных водоемов. В-третьих, тестирование одной группы особей дает такой же результат, как и тестирование многих групп (в тот же год, из того же водоема) на тот же стимул. В этом заключается мощность предложенного нами метода тестирования сеголеток амфибий на химические стимулы.

5.2. Запоминание амфибиями запаха родного водоёма. Представители разных экологических групп бесхвостых амфибий проявляют по окончании метаморфоза один и тот же тип реакции на естественные источники запаха родного водоёма, а именно предпочтение. Реакция предпочтения запаха родного водоёма коррелирует с наблюдаемым в естественных условиях поведением сеголеток. Такие сеголетки держатся у кромки воды родного пруда, а при испуге спасаются бегством в родной водоём (Бастаков, 1986).



Рис. 6. Проявление реакции предпочтения на знакомый химический маркёр у сеголеток прудовой лягушки в зависимости от периода экспозиции в маркёре.

В ходе проведённых опытов наша гипотеза о существовании в личиночном развитии двух периодов формирования предпочтения на знакомый химический маркёр получила подтверждение. Экспозиция личинок прудовой лягушки в химическом маркёре на стадиях 27(29)-34 и 42(47)-52 привела к формированию предпочтения этого маркёра у сеголеток по окончании метаморфоза (рис. 6). Минимальная продолжительность экспозиции в химическом стимуле составила в первый период 4 дня, во второй – не менее 15 дней. Экспозиция в химическом маркёре на стадиях 0-27(30) и 39-42(43) к формированию предпочтения не привела. Сеголетки прудовой лягушки не формируют предпочтения на химические стимулы среды обитания, с которыми они контактируют в короткий период после метаморфоза. Предпочтение химического маркёра формируется у травяной лягушки и зелёной жабы в ходе экспозиции в маркёре тоже на стадиях 30-34(38). В эксперименте экспозиция длилась 3-4 дня. Как сеголетки прудовой лягушки, так и сеголетки зелёной жабы проявляют избирательную реакцию на разные концентрации знакомого химического маркёра. Это позволяет амфибиям выбирать оптимальное положение в пространстве в градиенте концентраций этого стимула. Реакция отвергания знакомого стимула, обнаруженная в некоторых из опытных групп сеголеток, по-видимому, связана со свойствами химических веществ, применяемых в качестве маркёра среды обитания (Киселёва, 1984).

В наших экспериментах было показано, что комплексный стимул или смесь «всех»

химических веществ, присутствовавших в воде в период экспозиции оказывается более эффективным для выявления реакции сеголеток на знакомую химическую среду, чем отдельно взятые компоненты этой смеси. С этой проблемой связана трудность выявления реакции предпочтения на знакомый маркер у сеголеток, подвергшихся экспозиции в период активного питания личинок.

В работе не делалось попыток определить, какие именно хемосенсорные органы задействованы в восприятии предлагаемых химических стимулов. Однако тот факт, что сеголетки во время тестов реагировали предпочтением на очень низкие концентрации (10^{-9} моль/л) химических маркеров, говорит об участии обоняния в восприятии стимулов.

5.3. Динамика реакции амфибий на запах родного водоёма в онтогенезе. У разных экологических групп бесхвостых амфибий запоминание запаха родного водоёма может происходить в сходные этапы личиночного развития. Динамика реакции на запах родного водоёма после метаморфоза у них также сходна. Предпочтение характерно для сеголеток, придерживающихся ближайших окрестностей родного водоёма, индифферентность и отвергание – для расселяющихся особей. Различия связаны только со сроками наступления изменений в характере реакции после метаморфоза, что связано с особенностями биологии изучаемых видов. Наиболее долго, до 2 месяцев, проявляют после метаморфоза реакцию предпочтения запаха родного водоёма и наиболее долго держатся у родного пруда сеголетки прудовой лягушки. Из сухопутных видов дольше других подобное поведение демонстрируют сеголетки зелёной жабы. У травяной лягушки реакция может меняться очень быстро, по-видимому, в течение суток после выхода на сушу. Сеголетки серой жабы непосредственно после выхода на сушу реакции предпочтения не демонстрируют.

Между динамикой реакции на запах родного водоёма и этапами жизненного цикла вида наблюдается корреляция. Однако изменения в реакции на запах родного водоёма, вероятно, контролируются не только эндогенными факторами, но и внешними условиями. Влияние засушливости сезона на характер расселения и характер реакции на запах родного водоёма показано в работе для сеголеток травяной лягушки.

5.4. Можно ли считать процесс запоминания амфибиями запаха родного водоёма импринтингом? Естественной реакцией сеголеток на запах родного водоёма следует считать его предпочтение. В личиночном развитии прудовой лягушки обнаружены 2 «чувствительных» периода, когда контакт с химическим стимулом формирует предпочтение этого стимула у сеголеток по окончании метаморфоза. Заметного внешнего подкрепления в этом процессе не наблюдается. Это очевидно для первого «чувствительного» периода, когда запоминание происходит до начала активного питания личинок. Невозможность

модифицировать реакцию предпочтения знакомого химического стимула, запечатлённого в первый «чувствительный» период, у головастиков амфибий была показана в других работах (Waldman, 1981). По-видимому, память о запечатлённом стимуле может сохраняться у прудовой лягушки *R. lessonae* длительное время (до 2 лет после метаморфоза). Приведённые факты удовлетворяют критериям импринтинга. Исключительность некоторых критериев импринтинга в настоящее время подвергается сомнению, однако рассмотрение совокупности обстоятельств, детерминирующих «чувствительные» периоды, вне контекста импринтинга лишено биологического содержания (Хаютин, Дмитриева, 1991). Отмечается, что реакцию предпочтения знакомого химического стимула можно трактовать как результат импринтинга, в то время как реакция отвергания может быть следствием аверсивного обучения уже вне границ «чувствительного» периода (Sullivan et al., 2000).

5.5. Возможные механизмы запоминания запаха родного водоёма. У бесхвостых амфибий в развитии обонятельного анализатора можно выделить 3 этапа. Интенсивные процессы нейрогенеза имеют место в начале личиночного развития и во время метаморфоза. На первом этапе интенсивного нейрогенеза формируются системы главной полости и вомероназального органа. Во время метаморфоза преобразуется большая часть главной полости. Периоды интенсивного нейрогенеза разделены достаточно длительным периодом «покоя». В это время также продолжается увеличение количества рецепторов, но дифференцировка слоёв обонятельной луковицы задерживается до начала метаморфоза (Spaeti, 1978). Именно к 2 периодам активного нейрогенеза в обонятельной системе приурочены 2 «чувствительных» периода запечатления химических стимулов, обнаруженные в ходе нашего исследования.

В результате обонятельного импринтинга повышается чувствительность обонятельных рецепторов к запечатлённому химическому стимулу (Nevitt et al., 1994, Hudson, 1999). В нашей работе в результате экспозиции не только повышалась чувствительность сеголеток к знакомому химическому маркёру, но также возникла избирательная реакция на разные концентрации маркёра. Такое сложное поведение может быть организовано только на уровне центральной нервной системы, например, в обонятельной луковице.

В последнее время появляются данные об участии гормонов в регуляции процесса импринтинга (Nevitt et al., 1994, Plate, Hawryshyn, 2001). Исходя из наших данных, представляется маловероятным, что уровень секреции гонадотропных гормонов непосредственно определяет характер реакции на знакомый маркёр. Согласно современным представлениям, гормональная стимуляция лишь облегчает включение уже существующего поведенческого комплекса (Крученкова, 2002).

Выводы

1. Сеголетки прудовой лягушки *Rana lessonae*, озёрной лягушки *R. ridibunda*, травяной лягушки *R. temporaria*, зелёной жабы *Bufo viridis* и серой жабы *B. bufo*, отловленные в естественных условиях по окончании метаморфоза, могут проявлять реакцию предпочтения на запах родного водоёма. При этом сеголетки полуводных видов располагаются вблизи кромки водоёма, а сухопутные виды могут отходить от водоёма на небольшое расстояние, где задерживаются на непродолжительное время до начала расселения.
2. Запоминание запаха родного водоёма у бесхвостых амфибий целесообразно рассматривать в рамках импринтинга химических стимулов. В личиночном развитии присутствует по крайней мере один период запоминания химических стимулов, приводящий к предпочтению этих стимулов по окончании метаморфоза. Этот «чувствительный» период приходится на этап личиночного развития между вылуплением из икринных оболочек и началом активного питания личинок (стадии 27(30)-34(38)). По-видимому, существует также второй «чувствительный» период, приходящийся на этап личиночного развития между началом дифференцировки пальцев на задних конечностях и началом редукции хвоста (стадии 42(47)-52). Периоды запоминания коррелируют с этапами активного нейrogenеза в обонятельной системе. По предварительным данным, память о запечатлённом стимуле может сохраняться у прудовой лягушки до 2 лет после метаморфоза.
3. Динамика реакции на запах родного водоёма коррелирует с событиями жизненного цикла вида. Предлагается следующая схема. Сеголетки по окончании метаморфоза предпочитают запах родного водоёма, пока они держатся около этого водоёма. С началом расселения сеголеток реакция предпочтения запаха родного водоёма сменяется индифферентностью к нему или его отверганием. Взрослые особи в период размножения снова могут предпочесть запах родного водоёма.
4. Сухопутные и полуводные виды бесхвостых амфибий проявляют сходство как в сроках запечатления запаха родного водоёма, так и в динамике реакции на этот стимул после метаморфоза. Видоспецифичными являются сроки наступления периода расселения, которые определяют продолжительность проявления реакции предпочтения запаха родного водоёма у сеголеток.
5. Предложены рекомендации по методике исследования хемосенсорной ориентации взрослых бесхвостых амфибий. Необходимо использовать в работе комплекс методов:

разделять особей по стадиям жизненного цикла, предлагать в опыте набор разных концентраций стимула, экспериментировать с комплексностью стимула, комбинировать использование методик индивидуального и группового тестирования. Ввиду того, что сеголетки в одной группе схожи по характеру своих предпочтений в выборе стимула, но различаются мотивацией к выбору, наиболее надёжным способом описания реакции на стимул является проведение повторных или долговременных наблюдений. В силу своей эффективности и однозначности интерпретации результатов для разных видов амфибий, метод группового 40 мин. тестирования может быть применен для исследования хемосенсорной ориентации сеголеток бесхвостых амфибий.

Публикации по теме диссертации

1. Архипова К.А., Борисов В.В., Ван Юаньван, Го Даньян, Казаков А.С., Мехова Е.С., Минин К.В., Нильмаер О.В., Скворцов Т.А., Третьякова Ю.А., Уколова С.С., Шахпаронов В.В., Огурцов С.В., 2004. Параметры, определяющие тип реакции на запах родного водоёма у сеголеток травяной лягушки (*Rana temporaria*) и зелёной жабы (*Bufo viridis*) //Флора и фауна западного Подмосковья, Вып. 3, Издание Звенигородской биологической станции им. С.Н.Скадовского, под ред. В.М.Гаврилова, Изд-во Московского Университета, Москва (в печати)
2. Бочарова Е.С., Замкова М.А., Малышева С.В., Пономарёва Е.В., Тертицкая А.Г., Огурцов С.В., 2003. Особенности поведения взрослых бесхвостых амфибий в летний период //Флора и фауна западного Подмосковья, Вып. 2, Издание Звенигородской биологической станции им. С.Н.Скадовского, под ред. В.М.Гаврилова, Изд-во Московского Университета, Москва, с.154-163.
3. Огурцов С.В., 2004. Влияние экспозиции в химических стимулах в ходе личиночного развития на поведение сеголеток трёх видов бесхвостых амфибий после метаморфоза // Современная герпетология, Вып. 3 (в печати)
4. Огурцов С.В., Бастаков В.А., 2001. Реакции сеголеток лягушек и жаб на источники запаха родного водоёма и возможность их запечатления в ходе личиночного развития //Вопросы герпетологии. Материалы I съезда Герпетологического общества им. А. М. Никольского. Пущино, М.:МГУ, с. 205-207.
5. Bastakov V.A., Ogurtsov S.V., 2002. Early two-staged learning of native pond odor in anuran amphibians //Brain, Behavior and Evolution, V.60, p. 60.
6. Ogurtsov S.V., 2004. Olfactory orientation in anuran amphibians //Russian Journal of Herpetology, V.11, №1, p. 35-40.

7. Ogurtsov S.V., 2004. Basis of native pond fidelity in anuran amphibians: the case of chemical learning //Proceedings of the 12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia, 12-16 August, 2003 (in press).
8. Ogurtsov S.V., Bastakov V.A., 2000. Imprinting on native pond odour in the pool frog, *Rana lessonae* Cam. //Chemical Signals in Vertebrates IX. Program & Abstracts, Jagiellonian University, Krakow, Poland, July 26-30, 2000, p.77.
9. Ogurtsov S.V., Bastakov V.A., 2001. Imprinting on native pond odour in the pool frog, *Rana lessonae* Cam. //Chemical Signals in Vertebrates 9., Marchlewska-Koj A., Lepri J.J. and Müller-Schwarze D. eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p. 433-441.
10. Ogurtsov S.V., Bastakov V.A., 2001. Imprinting on native pond odour in anuran amphibians //Advances in Ethology 36. Supplements to Ethology. Contributions to the XXVII International Ethological Conference, Tübingen, Germany, 22-29 August 2001. R.Apfelbach, M.Fendt, S.Krämer, B.M.Siemers eds., Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Vienna, p. 232.
11. Ogurtsov S.V., Bastakov V.A., 2003. Basis of native pond fidelity in anuran amphibians: the case of chemical learning //12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Programme & Abstracts, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia, 12-16 August, 2003, p.121.
12. Shahparonov V.V., Ogurtsov S.V., 2003. Ecological mechanisms of dispersal of the green toad *Bufo viridis* Laur. youngs-of-the-year //Mobility of students and programmes flexibility in the prospect of the European unification of the training processes in ecology and environmental science. Italian-Russian student forum. Thesis of the forum. Palermo, 23-26 July, 2003, p.64.
13. Shahparonov V.V., Ogurtsov S.V., 2003. The role of the native pond odour in orientation of the green toad (*Bufo viridis*) youngs-of-the-year //12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Programme & Abstracts, Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia, 12-16 August, 2003, p.146.
14. Shakhparonov V.V., Ogurtsov S.V., 2004. The role of the native pond odour in orientation of the green toad (*Bufo viridis*) youngs-of-the-year //Proceedings of the 12th Ordinary General Meeting of Societas Europaea Herpetologica. Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia, 12-16 August, 2003 (in press).

Благодарности. Автор выражает свою признательность научным руководителям работы Б.Д.Васильеву и В.А.Бастакову. Большая благодарность сотрудникам лаборатории обработки сенсорной информации ИППИ РАН, сотрудникам лаборатории сравнительной нейробиологии позвоночных и группе химической коммуникации и хеморецепции ИПЭЭ РАН за неоднократное участие в обсуждении результатов работы и ряд важных замечаний, повлиявших на ход исследования. Хочется поблагодарить сотрудников Зоологического музея МГУ Е.А.Дунаева и В.Ф.Орлову за консультации по вопросам систематики группы европейских зелёных лягушек и за предоставленную возможность работать с библиотекой герпетологического отдела музея. Большую помощь оказали зарубежные коллеги: Б.Шаал (B.Schaal), Г.Д.Бёрд (G.D.Burd) и П.Дж.Хеппер (P.G.Hepper), любезно предоставившие необходимые оттиски статей. Особо хочется поблагодарить студентов биологического факультета МГУ Ю.А.Штыря, В.В.Федорина, П.Н.Флегонтова, Г.О.Кагарлицкого, П.К.Головатенко-Абрамова, Д.О.Кирюхина, В.В.Кожевникову, Н.А.Логинову, Е.А.Чудинову, О.В.Щербакову, Е.С.Мехову, В.В.Борисова, А.С.Казакова, К.В.Минина, К.А.Архипову, О.В.Нильмаер, Т.А.Скворцова, Ю.А.Третьякову, С.С.Уколову, Ван Юаньван, Го Даньяна, М.А.Грубмана, Н.С.Карпову, О.И.Малолеткину, О.Б.Мацелепу и Е.В.Усову, собравших часть материала по травяной лягушке и зелёной жабе в рамках летних самостоятельных работ. Н.А.Поярко помогал в проведении опытов с озёрной лягушкой. Важная часть материала по динамике расселения и реакции на естественные стимулы у зелёной жабы собрана студентом биологического факультета В.В.Шахпароновым в рамках выполнения курсовой работы. Автор признателен своему другу и коллеге Х.А.Эрнандес-Бланко за детальное обсуждение результатов исследования, помощь в поиске редкой зарубежной литературы и неоценимую моральную поддержку в ходе проведения работы. Автор благодарен к.б.н. В.В.Костину, к.б.н. Н.Ю.Васильевой, к.б.н. М.Е.Гольцману и д.б.н. Ю.Б.Мантейфелю за то, что они уделили время обсудить основные недостатки работы, которые не оставлены без внимания в окончательной версии диссертации. Отдельно хочется поблагодарить своих коллег Л.П.Корзуна, Т.Б.Голубеву, Л.И.Барсову, В.М.Шахпаронова, Н.Г.Бибикова и многих других за психологическую поддержку при обсуждении и написании окончательной версии диссертации. Участие в зарубежных конференциях было поддержано Российским Фондом Фундаментальных Исследований: гранты 00-04-58754 и 01-04-58802.