

## Raport științific

privind implementarea proiectului în perioada ianuarie – decembrie 2012

### Titlul proiectului: ESTE AREALUL LIMITAT DE CERINȚELE BIOLOGICE, CONDIȚIILE DE MEDIU SAU DE BARIERELE GEOGRAFICE? UN STUDIU DE CAZ UTILIZÂND BROAȘTELE DE PĂMÂNT (GENUL *PELOBATES*).

#### CONSIDERAȚII GENERALE

Anul 2012 a fost deosebit de secetos și nu a permis realizarea în bune condiții a unor pachete de activități. Din cauza uscăciunii, majoritatea habitatelor acvatice utilizate în anii obișnuiți pentru reproducere au secăt, ceea ce a limitat mult zona și perioada de studiu asupra mormolocilor. Uscăciunea extremă de la sfârșitul verii și din toamnă a îngreunat de asemenea procesul de marcare/recapturare, animalele fiind foarte puțin active în timpul nopții. Astfel, am întâmpinat dificultăți în realizarea integrală a activităților din teren B1, B2 și B4. Pentru a contrabalansa aceste dificultăți întâmpinate, am realizat observații în teren asupra reproducerii pe o populație de *P. fuscus* de la Sălicea, jud. Cluj, studiată anterior (Szekely și Nemes, 2002<sup>1</sup>) și am diversificat experimentele și analizele de laborator (activitatea B2c, C1, C2, D1, D2, E1 și F). Pentru desfășurarea activităților în perimetrul Vadu - Grindul Lupilor am solicitat și obținut din partea ARBDD permisul de cercetare nr. 9/20.02.2012.

#### PREZENTAREA REZULTATELOR PE PACHETE DE LUCRU ȘI/SAU ACTIVITĂȚI

##### A. Studiu de birou

Am continuat completarea bazei de date de distribuție actuală cu date de pe întregul areal, obținând pentru *P. fuscus* 3085 semnalări de pe întregul areal (din care 388 în România) iar pentru *P. syriacus* 341 (din care 52 în România). Baza de date a fost completată și cu datele de teren obținute în cadrul activității B1. Datele au fost obținute dintr-o varietate de surse: literatură, baze de date online, comunicări personale, din hărți publicate și atlase de distribuție naționale sau regionale prin digitizare, etc. De asemenea a fost completată baza de date de paleoherpetologie ce include în prezent 83 de semnalări care se referă strict la cele două specii studiate, din care 57 pot fi utilizate pentru activitatea E1 (51 pentru *P. fuscus* și 6 pentru *P. syriacus*).

##### B. Studiu de teren

**B1.** Au fost selectate locațiile pentru studiile de marcare/recapturare la Vadu și Grindul Lupilor (activitatea B2), iar suplimentar pentru activitatea B4 - Viile și Greci. Am identificat variabilele (în număr de 22) ce urmează a fi determinate pentru caracterizarea utilizării habitatului acvatic și a celui terestru (pe baza unor cercuri concentrice cu raza de 50, 200 și 400 m) și am elaborat și testat un model de fișă de teren. Modul de utilizare al habitatului a fost determinat pe suprafațe concentrice cu raza de 200, 500 și 1000 m în jurul fiecărui punct de inventariere. Toate variabilele ce caracterizează habitatul terestru au fost analizate utilizând softul ArcGIS Desktop 9.3.1 (licență ArcInfo) și harta CORINE Land Cover. Cele două specii se găsesc cu precădere în terenuri arabile neirigate și zone umede, dar și diferă în tipul de habitat utilizat: în timp ce *P. fuscus* este prezent și în păduri de foioase, *P. syriacus* în zona litorală ocupă și mlaștini sărate (tabelul 1).

Tabelul 1. Media ponderii procentuale a tipurilor de habitat prezente cu o pondere mai mare de 10% în perimetrul determinat de cercuri cu raza diferită în jurul punctelor unde au fost identificați indivizi din cele două specii.

Suprafața (ha)	Raza 1000 m	Raza 500 m	Raza 200 m	Cod CLC 2006	Tipul de habitat
<i>P. fuscus</i> n = 46	33	28	24	211	Teren arabil neirigat
			16	231	Pajiști
	20	20	18	311	Păduri de foioase
			12	411	Zone umede
<i>P. syriacus</i> N=35	32	30	26	211	Teren arabil neirigat
	21	23	27	411	Zone umede
	11	10		421	Mlaștini sărate

<sup>1</sup> Szekely, P., Nemes, S., 2002. Sex ratio and sexual dimorphism in a population of *Pelobates fuscus* from Transylvania, Romania. Zeitschrift fur Feldherpetologie, 9: 211-216.

**B2.** Au fost colectate 38 de perechi de *P. syriacus* în amplex care au depus panta în laborator. Animalele au fost măsurate și cântărite atât înainte cât și după depunere. Înainte de a fi eliberate animalelor li s-au amputat două falange pentru analiza scheletocronologică (activitatea D1). Panta a fost fotografiată, ouăle numărate și eșantioane din ele măsurate. Analiza a arătat că deși masculii sunt în general mai mari ca dimensiuni decât femelele, nu le depășesc în greutate. Nu am găsit nici o asocieră între dimensiunile, greutatea (figura 1) sau vârsta masculilor și femelelor în amplex. Scăderea în greutate în cursul reproducerii a fost în medie de 27% pentru femele și de 3,9% pentru masculi (figura 2). Numărul mediu de ouă dintr-o panta a fost de  $2817 \pm 1551$  (domeniu 865-5812). Greutatea inițială a femelelor și pierderea în greutate la reproducere au fost corelate pozitiv cu mărimea pantei ( $R^2=0,94$  și respectiv  $R^2=0,86$ ,  $n=35$ ,  $p<0,001$ ).

Activitățile B3 și B4 vor fi realizate în 2013.

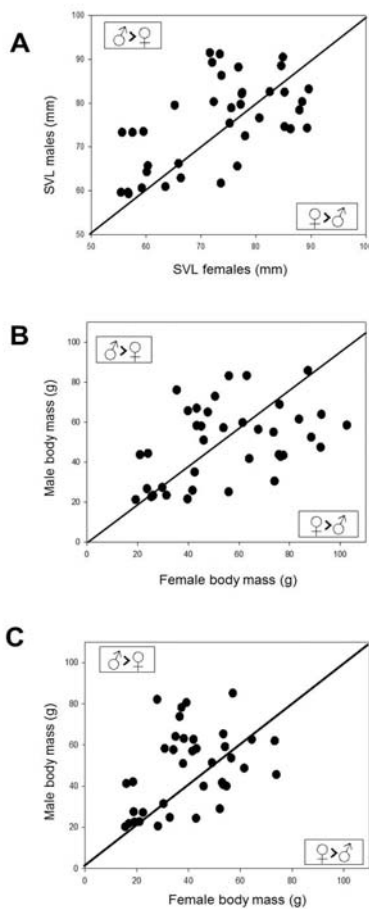


Fig. 1. Relația între lungimea corpului (SVL) (a), greutatea înainte de depunere (b) și după depunerea pantei (c) dintre cele două sexe aflate în amplex. Punctele situate deasupra liniei aparțin perechilor în amplex unde masculii erau de dimensiuni mai mari.

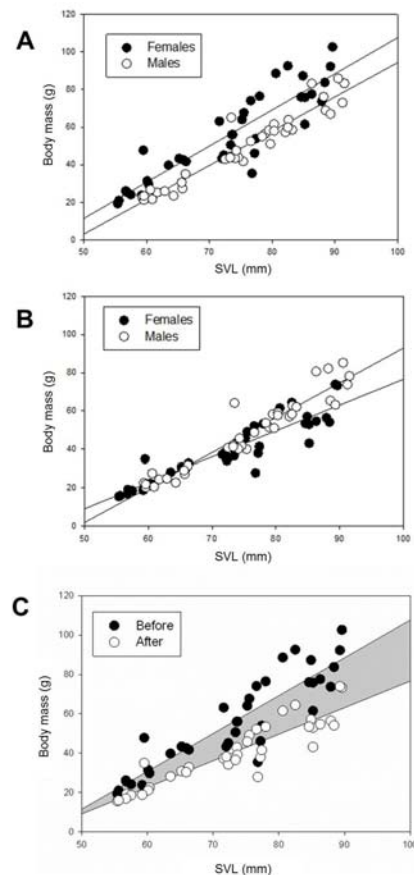


Fig. 2. Corelația dintre lungimea corpului (SVL) și greutatea la cele două sexe înainte (a), după depunerea pantei (b), și diferențele în panta dreptelor de regresie în cazul femelelor înainte și după depunere (c).

### C. STUDII EXPERIMENTALE

**C1.** Au fost realizate trei seturi de experimente:

**a. Efectul scăderii nivelului apei asupra duratei și dimensiunilor la metamorfoză.** Au fost colectați mormoloci ai celor două specii de pe Grindul Lupilor și crescuți în vase experimentale de plastic, utilizându-se trei variante experimentale: 1 - tratamentul control, cu nivel constant al apei, 2 - tratamentul de descreștere a nivelului apei și 3 - tratamentul cu volum de apă constant dar scăzut. În cazul ambelor specii mormolocii din tratamentul 2 au reușit să-și accelereze metamorfoza ca răspuns la reducerea nivelului apei diferența fiind aceea că la *P. syriacus* acest efect a fost observat și la mormolocii din tratamentul 3 sugerând o mai bună adaptare a acestora la condițiile de uscăciune din

Dobrogea (figura 3). De asemenea, greutatea și lungimea a diferit semnificativ între tratamente și specii, metamorfii de *P. syriacus* fiind semnificativ mai mari decât cei de *P. fuscus*.

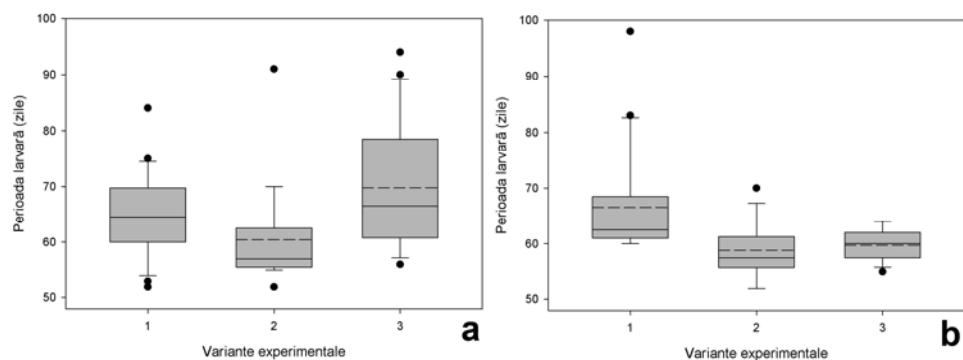


Fig. 3. Durata metamorfozei la mormolocii de *P. fuscus* (a) și *P. syriacus* (b) pentru cele trei variante experimentale. Cu linii punctate sunt reprezentate mediile pentru fiecare variantă.

**b. Toleranța la salinitate.** A fost determinat efectul salinității asupra dezvoltării larvare și a ratei de supraviețuire până la metamorfoză la mormoloci de *P. fuscus*. Experimentul a cuprins trei tratamente de salinitate, respectiv de 2, 4 și 8 ‰, raportat la un control (apă deionizată). Larvele au fost introduse în experiment în stadiul Gosner 27 și au fost distribuite câte două în trei replicare pentru fiecare tip de tratament. Am urmărit următorii parametri: (i) timpul necesar pentru metamorfoză, (ii) greutate și dimensiuni la metamorfoză și (iii) rata de supraviețuire în decursul experimentului. Nu au existat diferențe semnificative între tratamentele 2 și 4 ‰ și control în ceea ce privește durata medie până la metamorfoză sau greutatea și dimensiunile atinse la momentul metamorfozei. Rata de supraviețuire a larvelor a fost de 0% în cadrul tratamentului 8 ‰ însă în cazul celorlalte două tratamente nu am găsit diferențe semnificative statistic raportat la control. Rezultatele obținute arată că larvele de *P. fuscus* tolerează ape salmastre cu salinitate de până la 4 ‰, neputând însă supraviețui dincolo de acest prag.

**C2.** Am urmărit rata de creștere timp de trei luni la câte 20 de juvenili proaspăt metamorfozați din cele două specii, hrăniți în două variante experimentale: intensiv și redus. Rezultatele au indicat o rată de creștere mai mare la *P. syriacus* comparativ cu *P. fuscus* hrănit intensiv, dar o toleranță mai ridicată la lipsa hranei la cei din urmă, care au reușit să mențină un ritm de creștere relativ constant (figura 4).

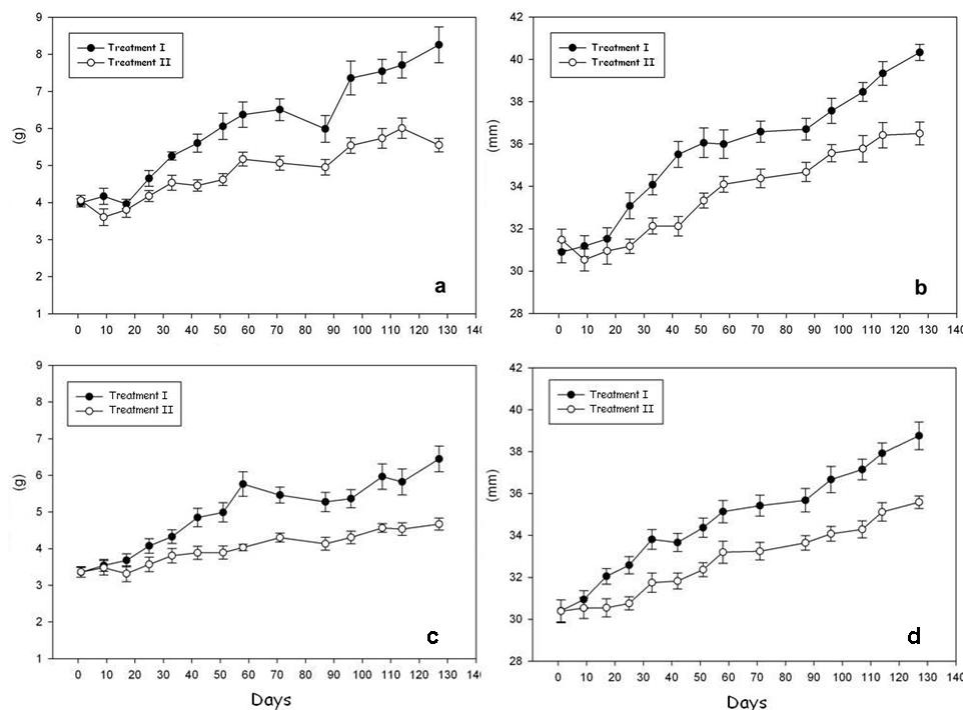


Fig. 4. Ritmul de creștere comparativ la *P. syriacus* (a și b) și *P. fuscus* (c și d), în funcție de greutate (a și c) și lungimea corporală (b și d).

**c. Dinamica activității la cele două specii ale genului *Pelobates*.** Comportamentul unui eșantion alcătuit din câte 6 indivizi din fiecare specie a fost monitorizat pe perioada nopții când aceștia sunt activi, folosind camere web Logitech HD Pro c920, setate să preia imagini la intervale fixe de timp. Ulterior, folosind programul ImageJ s-a putut marca poziția exactă a indivizilor pe fiecare imagine în parte, ceea ce permite calcularea unor variabile ce

caracterizează comportamentul, cum ar fi distanța parcursă de animale în fiecare noapte, perioada cât acestea sunt active, precum și viteza medie de deplasare. Rezultatele preliminare indică faptul că indivizii de *P. syriacus* sunt mult mai activi decât cei de *P. fuscus*, distanța medie parcursă de aceștia în fiecare noapte fiind de 1909,5 cm, comparativ cu 316,5 cm pentru *P. fuscus*, viteza medie fiind de asemenea mult mai mare (7,63 cm/min pentru *P. syriacus* comparativ cu 1,82 cm/min pentru *P. fuscus*). Timpul mediu petrecut la suprafață (perioada în care animalul este considerat activ) nu a diferit substanțial între cele două specii (254,5 min *P. syriacus* și 269,7 min *P. fuscus*). Aceste observații preliminare indică faptul că *P. fuscus* tinde să se înscrie în tiparul prădătorilor la pândă (sit and wait), în timp ce *P. syriacus* tinde să caute hrana activ.

#### D. ANALIZE ÎN LABORATOR

**D1. Estimarea structurii pe vârste.** A fost determinată vârsta prin scheletocronologie la un eșantion de 72 adulți de *P. fuscus*, 77 adulți de *P. syriacus* și aproximativ 20 juvenili din ambele specii utilizați pentru calibrarea citirilor. Cele două specii diferă semnificativ în ceea ce privește vârsta medie, indivizii de *P. syriacus* fiind mai longevivi, dar nu există diferențe semnificative între cele două sexe în cadrul unei specii, sau între vârsta la maturitatea sexuală, indiferent de specie sau sex (Tabelul 2).

Tabelul 2. Caracteristicile structurii pe vârste la două populații sintopice de broaște săpătoare de pe Grindul Lupilor.

Specia	Sex	Mărimea probei	Vârsta în ani (media ± SD)	Min- Max	Vârsta la maturitatea sexuală (media ± SD)	Min-Max
<i>P. fuscus</i>	Masculi	43	5,08±1,2	2-7	3,56 ± 0,7	2-5
	Femele	34	4,99 ± 1,2	3-8	3,15 ± 0,7	2-5
<i>P. syriacus</i>	Masculi	34	7,48 ± 1,5	4-11	3,54 ± 0,9	2-6
	Femele	38	7,3 ± 1,8	3-12	3,26 ± 0,7	2-4

Cele două specii diferă și în ceea ce privește lungimea și greutatea corpului, dimorfismul sexual fiind prezent doar la *P. fuscus* (figura 5). Curba de creștere a lungimii corpului în funcție de vârstă prezintă caracteristici diferite la *P. fuscus* dar similare la *P. syriacus* (figura 6).

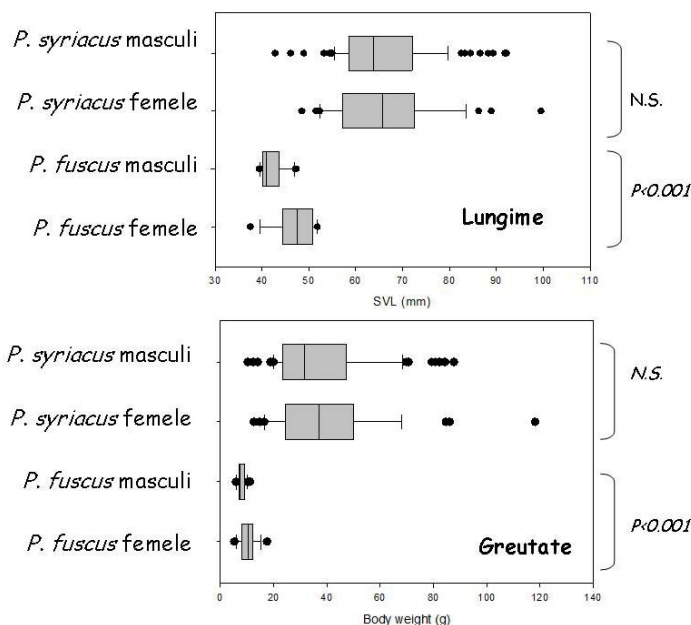


Fig. 5. Diferențele în dimorfismul sexual în funcție de lungimea corpului și greutate la cele două specii de *Pelobates* studiate. Gradul de semnificație al diferențelor statistice între dimensiunile celor două sexe sunt prezentate în partea dreaptă (NS – nesemnificativ).

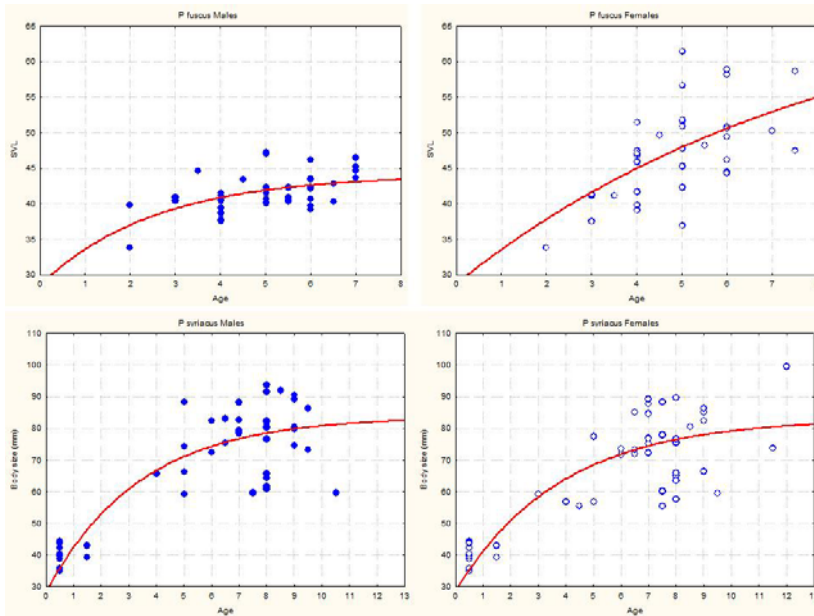


Fig. 6. Curba de creștere exprimată prin ecuația von Bertalanffy la cele două specii: sus *P. fuscus* iar jos *P. syriacus*.

#### ACTIVITĂȚI ȘI COLABORĂRI NOI ÎNȚINUTE ÎN CADRUL PREZENTULUI PROIECT

- Două publicații recente asupra structurii genetice a populațiilor de *P. syriacus* din Israel, la limita sudică de răspândire (Munwes et al., 2010<sup>2</sup>) au evidențiat o diversitate genetică sporită la periferie contrar predicției de abundență ridicată în centru. Pe baza acestui studiu am formulat ipoteza că și la limita nordică a arealului diversitatea genetică a populațiilor este ridicată. În colaborare cu Dr. Wiesław Babik de la Institute of Environmental Sciences, Universitatea Jagiellonă, am inițiat un studiu pilot de analiză a diversității genetice la 5 populații de *P. syriacus* din România.
- Observațiile realizate pe animale în captivitate au indicat o activitate nocturnă diferită între indivizii celor două specii de *Pelobates*. Pentru studiul dinamicii activității nocturne a animalelor am pus la punct împreună cu Dr. Mathieu Denoel, Behavioural Biology Unit - Institute of Zoology, Department of Environmental Sciences - University of Liège, un protocol de lucru bazat pe filmarea în timpul nopții, la lumină roșie a activității animalelor.
- Diferențele observate în semnalele sonore emise de broaște atât în teren cât și în laborator ne-au indicat o nouă direcție de studiu, respectiv cuantificarea și caracterizarea diferențelor în semnalele sonore emise de masculi (advertisement call) și de ambele sexe (release call, distress call). Pentru o analiză aprofundată a înregistrărilor am stabilit o colaborare cu Laboratorul Fonozoo din cadrul Muzeului Național de Științe Naturale din Madrid, Dr. Rafael Marquez.
- Semnalarea pentru prima dată în România la Sighișoara a chitridiomicozei (Vörös și Hartel, in press) ce reprezintă un risc ridicat pentru populațiile de amfibieni, a reprezentat motivul pentru care în colaborare cu Dr. Judit Vörös de la Hungarian Natural History Museum am inițiat un parteneriat în vederea analizării de probe colectate din zonele de studiu, atât pe broaște săpătoare cât și pe alte specii de amfibieni. Analizele preliminare au evidențiat existența chitridiomicozei și la sud de Carpați, dar nu și la populațiile de broaște săpătoare analizate.
- Rezultatele preliminare ale modelărilor realizate în cadrul activității E1 au evidențiat importanța decelării factorilor climatici responsabili pentru o anumită distribuție spațială, la limita arealului, unde populațiile sunt expuse în cel mai înalt grad riscurilor cauzate de modificările globale. În vederea extinderii studiului nostru, am depus un proiect în colaborare cu Dr. Federico Marangoni, Universidad Nacional de Misiones, Argentina, pentru analiza comparativă a răspunsului populațiilor aflate la limita arealului (titlul proiectului *Impactul modificărilor globale asupra populațiilor aflate la limita arealului*).

Director proiect,

*Coșatniceanu*

<sup>2</sup> Munwes, I., Geffen, E., Roll, U., Friedmann, A., Daya, A., Tikochinski, Y., Gafny, S. 2010. The change in genetic diversity down the core-edge gradient in the eastern spadefoot toad (*Pelobates syriacus*). *Molecular Ecology* 19: 2675–2689.