

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

最佳創意獎

040721

密視事件---探討澤蛙蝌蚪之密度效應與視覺感受機制

學校名稱：國立新竹女子高級中學

作者： 高二 廖思羽	指導老師： 鄭惠文
---------------	--------------

關鍵詞：密度效應、種內競爭、腎上腺皮質素

摘要

「在擁擠的族群裡頭，生物體必須競爭有限的資源以及空間」，這種族群密度過高導致對成長、發育、生育率、死亡率的影響通稱為「密度效應」。然而密度效應其表面下的過程及機制是我們所不知道的，於是我們設計一系列的實驗來探討密度影響澤蛙蝌蚪的感受及反應機制。結果發現澤蛙蝌蚪在食物充足的情況下，密度愈高其成長率愈慢。若放入鏡子來使蝌蚪所見到的個體數量加倍，蝌蚪的成長也會變慢，其成長率就像是密度增加一倍的時候一樣。如果在水中添加壓力激素，發現會使蝌蚪的成長率會如密度變高的時候一樣明顯減緩。本研究顯示澤蛙蝌蚪在面臨族群密度增加的壓力時，會以視覺當作感受機制，並可能是壓力激素在體內的濃度增加，使蝌蚪產生相對的生理反應，為因應環境的改變將能量重新分配而導致生長減緩。

壹、研究動機

在前往學校的路上有一片雜草地，每當下雨時草地就會處處積水，有一次經過發現積水裡面有很多蝌蚪，當有一陣子是乾燥少雨的天氣時，積水的水量便會變少，縮小了蝌蚪的活動空間，蝌蚪比肩繼踵地被限制在有限的水體中，沒有足夠的活動空間以及食物來源，詢問之下知道這是澤蛙的蝌蚪，且澤蛙會利用臨時積水潭來當作產卵地點。高一時基礎生物課本裡面學過的生物間交互作用，其中一項是競爭，同種或不同種的生物如果使用相同的資源(食物或空間)，彼此間會互相競爭有限的資源，當族群密度上升時，激烈的競爭會使其中個體的生長速度變慢或遭到淘汰。那在這麼高密度的澤蛙蝌蚪會不會也有競爭存在?從感受與反應的過程來看，當外界環境中密度產生變化時，介質會傳至蝌蚪體內的受器產生感覺，而受器接收到的感覺會刺激神經系統以及內分泌系統產生反應，例如神經衝動或激素的分泌，進而影響個體的活動與生長。為了探究單純的空間是否會引起密度效應，我們於是進行而在本實驗中，設定「影像」為介質，「眼睛」為受

器的視覺感應，並以壓力激素來模擬遭受密度壓力時可能反應的內分泌機制。

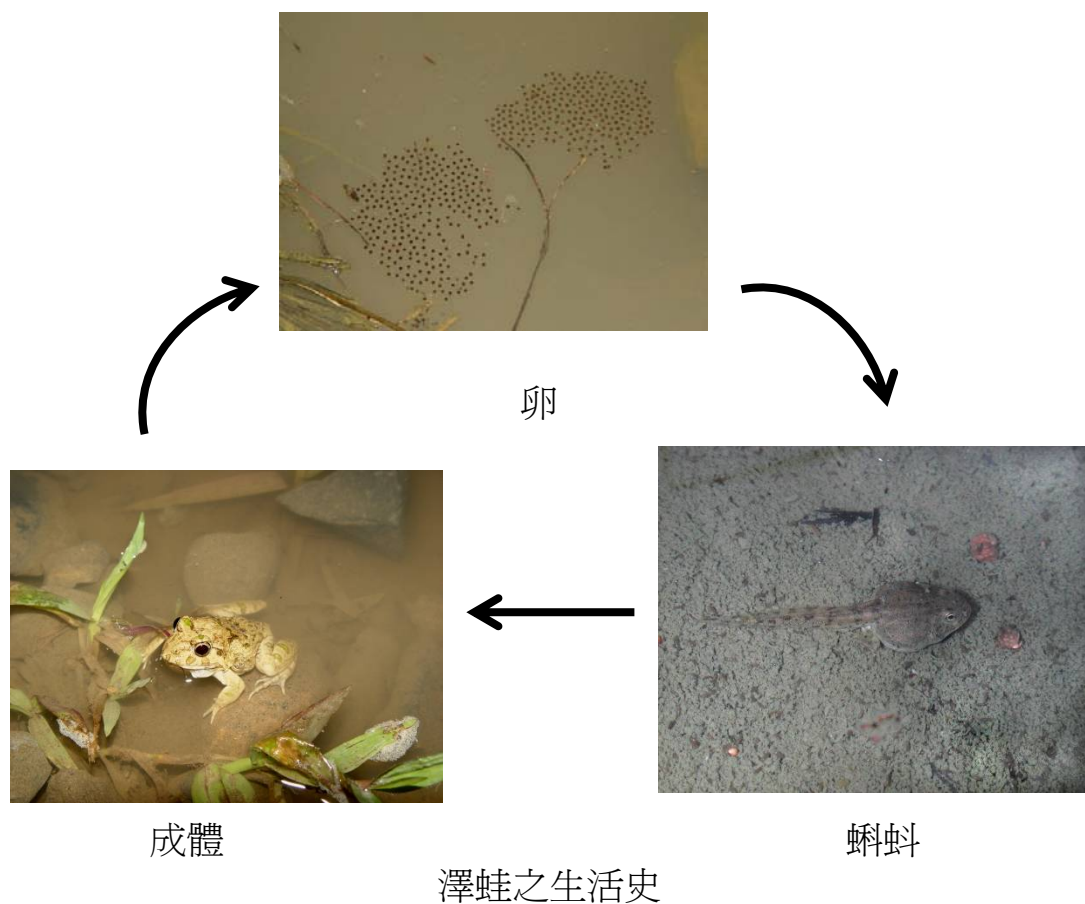
貳、研究目的

- 一、瞭解澤蛙蝌蚪是否有空間上的密度效應。
- 二、探討視覺是不是澤蛙蝌蚪的感受機制來引發密度效應。
- 三、探討壓力激素會不會產生與蝌蚪遭受密度變高時的相同影響。

參、研究設備及器材

一、澤蛙的基本認識及生活史

澤蛙，以前學名是 *Rana limnocharis*，現在因分類技術的進步改為 *Fejervarya limnocharis*，屬於赤蛙科(Ranidae)的一種中型蛙類，普遍分布於全台灣平地及低海拔山區的稻田、溝渠、水池、草澤等靜止水域，繁殖期為三到十月，但以春夏為主，雄蛙體長約 4-5 公分，雌蛙約 5-6 公分，卵粒小，卵塊成一大片漂浮在水面上方，每次產 700 至 1600 粒卵，雌蛙一年可多次產卵，蝌蚪小型，背面成橄欖綠色，有棕色斑點，尾部細長有深色細斑，尾長為體長的兩倍。本實驗的澤蛙蝌蚪，是在夏末採自市郊灌溉的水稻田之中，我們採集剛剛從卵團孵化出，而且已經會游泳的蝌蚪。

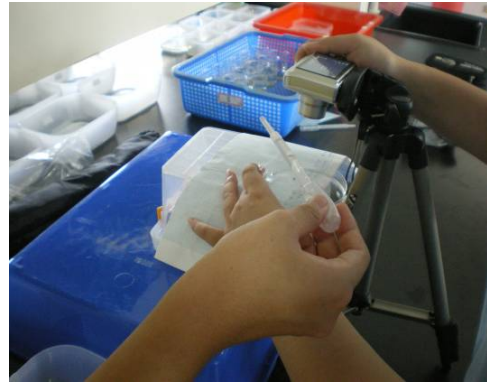


二、器材

方格紙	1 本	滴管	數支
大籃子	6 個	撈網	1 個
大籃子	6 個	相機	1 台
腳架	1 個	培養皿	2 組
蝌蚪	600 隻	莧菜	適量
盒子(7.5×11cm×6cm)	70 個	標籤紙	數張
腎上腺素	於每次換水後注入 5ml	針	數支
腎上腺皮質素	於每次換水後注入 5ml	夾鏈袋	數個
曝氣去氯水			



飼養蝌蚪之培養盒



照相裝置

肆、研究過程或方法

一、飼養技術

(一)換水：先將蝌蚪移開，清洗原先的盒子之後裝適量已曝氣的自來水，再將蝌蚪移回。



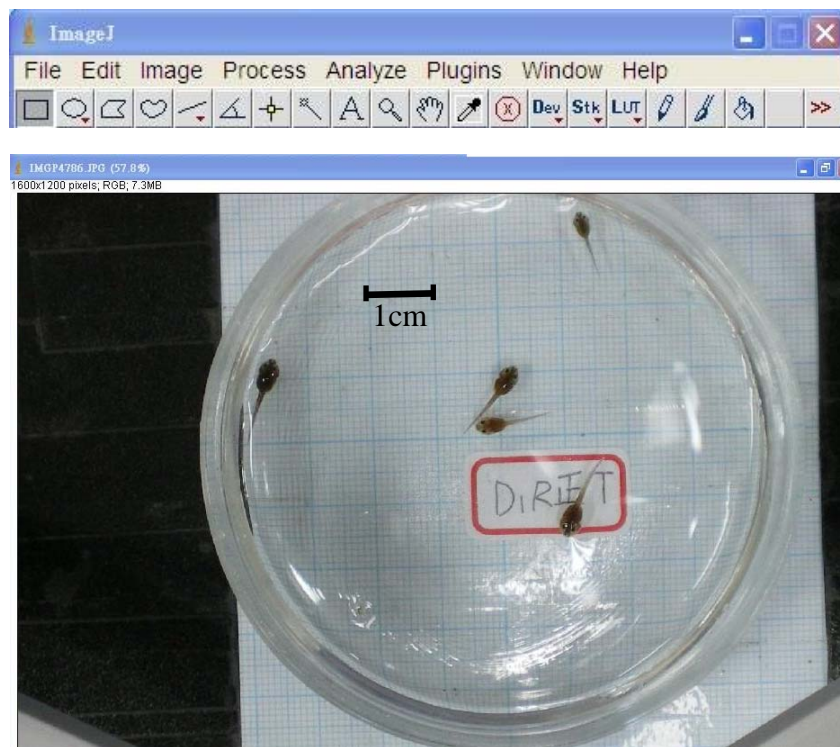
(二)餵食：把莧菜用水煮爛，打成爛泥狀，用紗布過濾掉水分，最後分裝在夾鏈袋中，著名好製作日期後，放到冷凍庫保存，餵食時，將其解凍並取足量放入每盒中，每次取適量餵食，並確量食物是充足的。



(三)拍照：把相機架在腳架上使相機平行於桌面，並在培養皿下墊註明好日期及組別的方格紙來當作比例尺。



(四)測量：使用軟體 ImageJ 量出每隻蝌蚪的實際長度，於每盒中取中位數後，利用 10 組中所得到的數據取算數平均數及標準差。



(五)統計分析：我們以變異數分析(ANOVA, Analysis of variation)來進行多組之間的比較，如果多組之間有達到顯著差異，便進一步用 Tukey HSD 來找出哪幾組之間是有顯著差異的，並以英文字母表示，不同組別如果擁有相同的字母即代表沒有顯著差異。所有的統計分析是在 SPSS 軟體下執行。

二、實驗方法

實驗一：探討密度對蝌蚪生長速度的影響

(一)目的與假說：每一隻動物都有所需要的資源以及活動空間，當食物資源充足的時候，如果純粹空間上的密度效應的確存在，那麼當每一隻個體分配到的空間愈小時，應該會對個體產生愈強烈的不良影響。反之，如果沒有空間上的密度效應，那麼在食物充足的條件下，蝌蚪之間的成長便不會受到影響。

(二)實驗步驟：

1. 取 30 個飼養盒子(底面積為 7.5cm×11cm)，分別加入曝氣三天的曝氣水達 4 公分高。
2. 隨機將同樣大小的蝌蚪分成三個組別，其中低密度組每盒放入 5 隻、中密度組 10 隻、高密度組 20 隻。每一個組別重複 10 次，共使用了 350 隻蝌蚪。
3. 以拍照及測量的方法記錄蝌蚪實驗開始時的體長，之後每週記錄一次蝌蚪的體長變化。
4. 每 3-4 天換水並餵食一次（每週兩次）。
5. 每一次的測量回得到全部的蝌蚪體長，每一飼養盒選其中位數當作該飼養盒的蝌蚪體長平均值。每一組會分別有 10 個數據。
6. 重複步驟 3 到步驟 5，當有蝌蚪變成小蛙(前肢伸出)時則停止記錄，因為蝌蚪變態的過程中尾巴會縮短而影響體長數據的精確性。



低密度組
每盒飼養 5 隻蝌蚪



中密度組
每盒飼養 10 隻蝌蚪



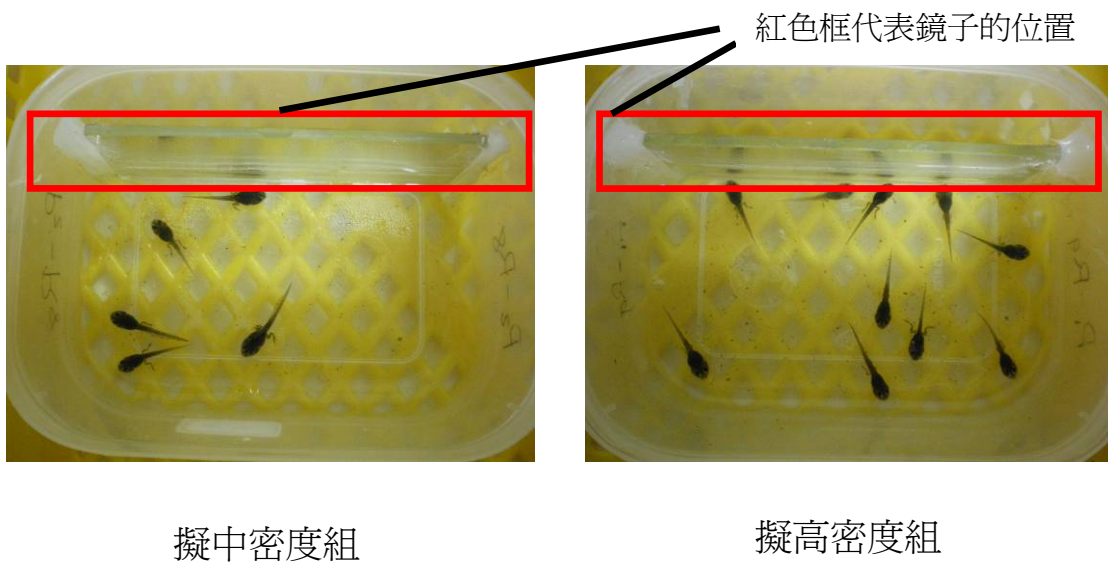
高密度組
每盒飼養 20 隻蝌蚪

實驗二：探討視覺是否是密度效應的感受機制

(一)目的與假說：視覺是蝌蚪用來感受外界環境的重要感官系統，因此我們假設密度效應是可以透過視覺來引發的，那麼當視覺上蝌蚪數量加倍時，應該會引起與實際密度增加時一樣的影響，反之，如果視覺無法引起密度效應，那麼視覺上蝌蚪數量的增加並不會對其生長產生影響。

(二)實驗步驟：

1. 取 20 個與實驗一相同之飼養盒，分別加入曝氣三天的曝氣水達 4 公分高。
2. 將蝌蚪隨機分成擬中密度組以及擬高密度組，其中擬中密度組的蝌蚪數量與實驗一的低密度組相同，而擬高密度的蝌蚪數量與實驗一的中密度相同。兩組各重複 10 次，共用了 150 隻蝌蚪。
3. 在飼養盒的一側長邊放入一面鏡子，使盒中的蝌蚪數量看起來是加倍的。
4. 重複實驗一的實驗步驟 3 到實驗步驟 6，直到蝌蚪變態成小蛙。



實驗三：探討壓力激素是否會產生與密度效應相同的影響

(一)目的與假說：動物在周遭環境發生變化時，像是突然來的壓力，或是長期的外在壓力，通常會產生人稱壓力激素的腎上腺素(adrenaline)以及腎上腺皮質素(corticosteron)。我們假設當蝌蚪偵測到密度變高時，身體也會產生壓力激素，進而造成密度效應。因此當壓力激素濃度高時，會有類似高密度的影響。反之，若壓力激素濃度升高時，沒有類似高密度的影響，那麼此兩種激素應該就沒有參與到產生密度效應的過程之中。

(二)實驗步驟：

1. 取 20 個與實驗一相同之飼養盒，分別加入曝氣三天的曝氣水達 4 公分高。
2. 將蝌蚪隨機分成腎上腺素組以及腎上腺皮質素組，每盒飼養 5 隻蝌蚪(與實驗一的低密度相同)，並重複 10 次，共用了 100 隻蝌蚪。
3. 重複實驗一的步驟 3 到步驟 6，並在每一次換水後，在腎上腺素組注射 5ml 的腎上腺素到水中。在腎上腺皮質素組則是在換水後注射 5ml 的腎上腺皮質素到水中。



腎上腺素組

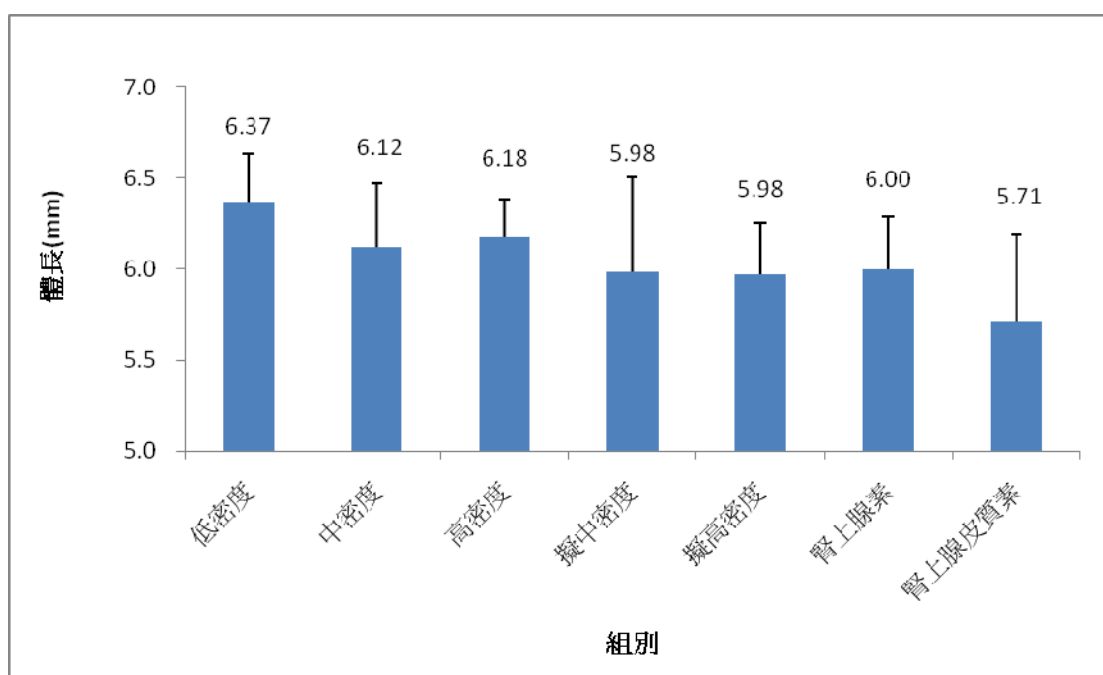


腎上腺皮質素組

伍、研究結果

一、資料起使值

實驗一到實驗三，我們總共有七個組別將做比較，雖然蝌蚪是隨機分配到各個組別，但我們發現其一開始的起使值仍是不一致的，並且達到顯著差異 (ANOVA, $F_{6,63}=3.35$, $P=0.006$)，個別分析發現是低密度組的起始值顯著比腎上腺皮質素組還高，其他組別間則沒有顯著差異，因此在之後的比較我們將以蝌蚪體長增加率（除以起始體長）來進行。

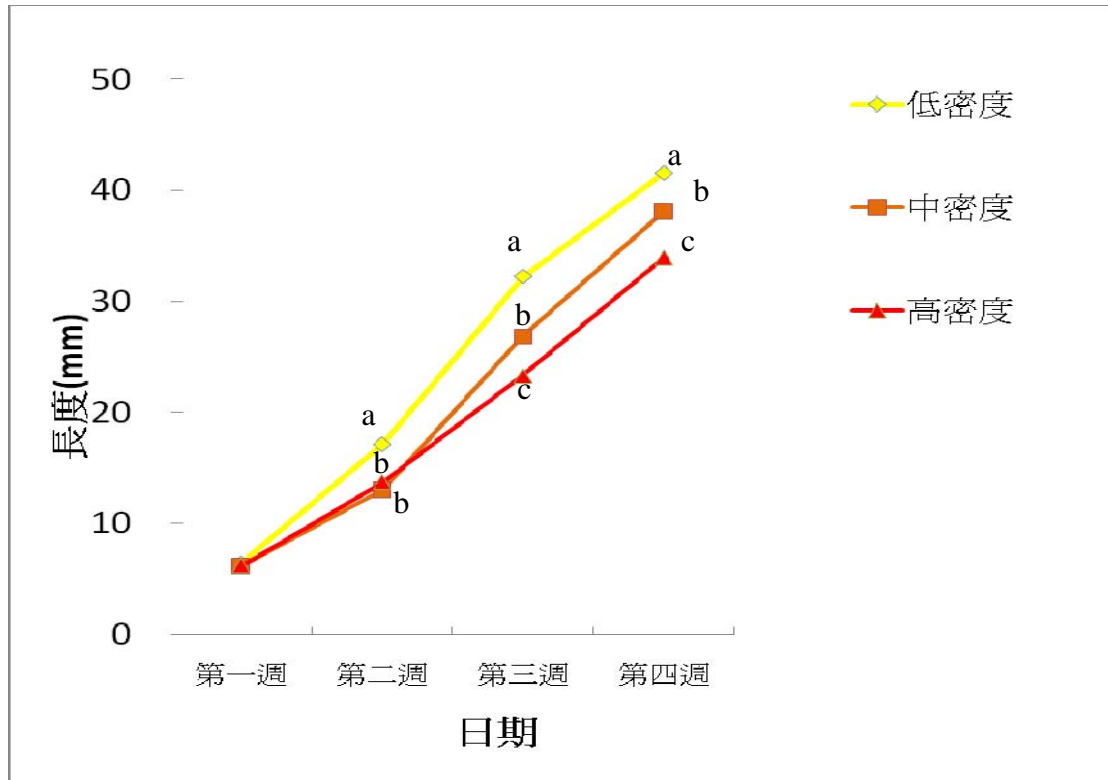


圖一、各組別蝌蚪體長起使值

二、實驗結果

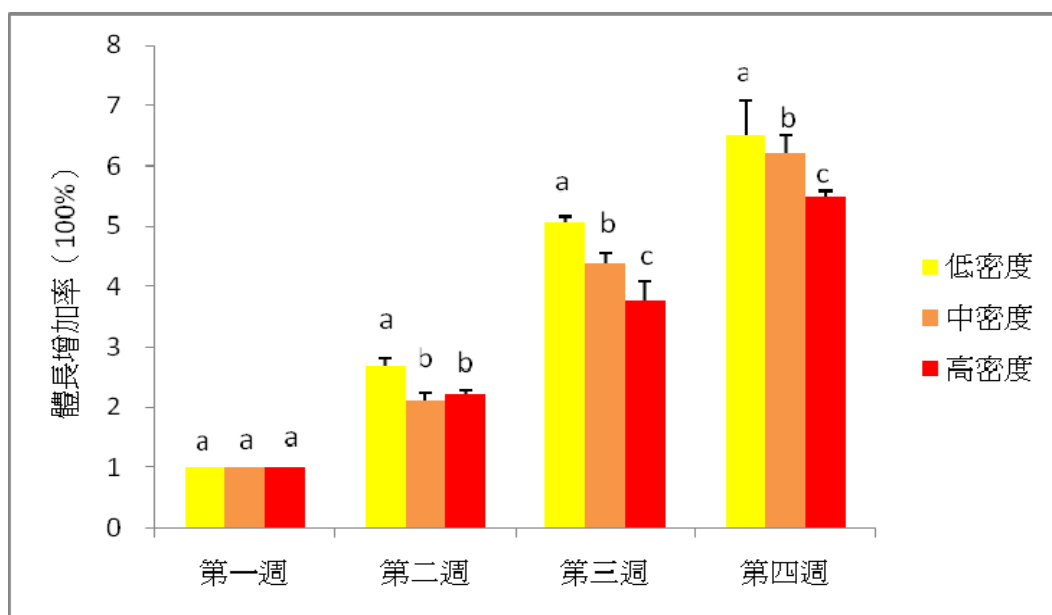
(一)實驗一

在實驗開始時，低、中、高密度組別的體長並沒有差異，從第三週開始，低、中、高密度之間皆已產生明顯差距(圖二)，且此差距一直延續到實驗結束，由此可證實密度效應的存在。



圖二、不同密度下蝌蚪的成長曲線

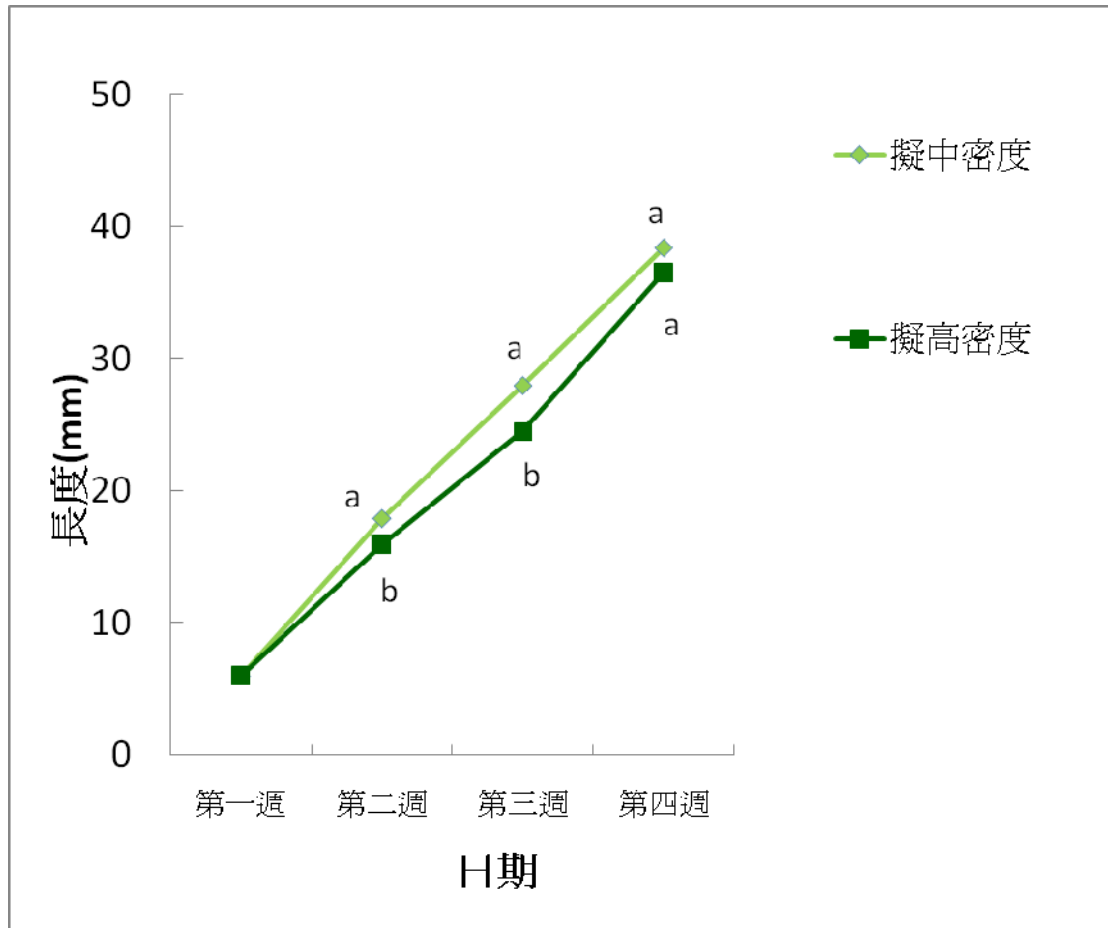
我們將蝌蚪體長以增加率繪製成柱狀圖，亦可明顯的看出密度愈高，蝌蚪的成長愈慢，也證實有密度效應的存在(圖三)，從第三週起，不論是在低、中密度間，中、高密度間，還是在低、高密度間皆具有顯著差異。



圖三、不同密度處理下澤蛙蝌蚪的體長增加率

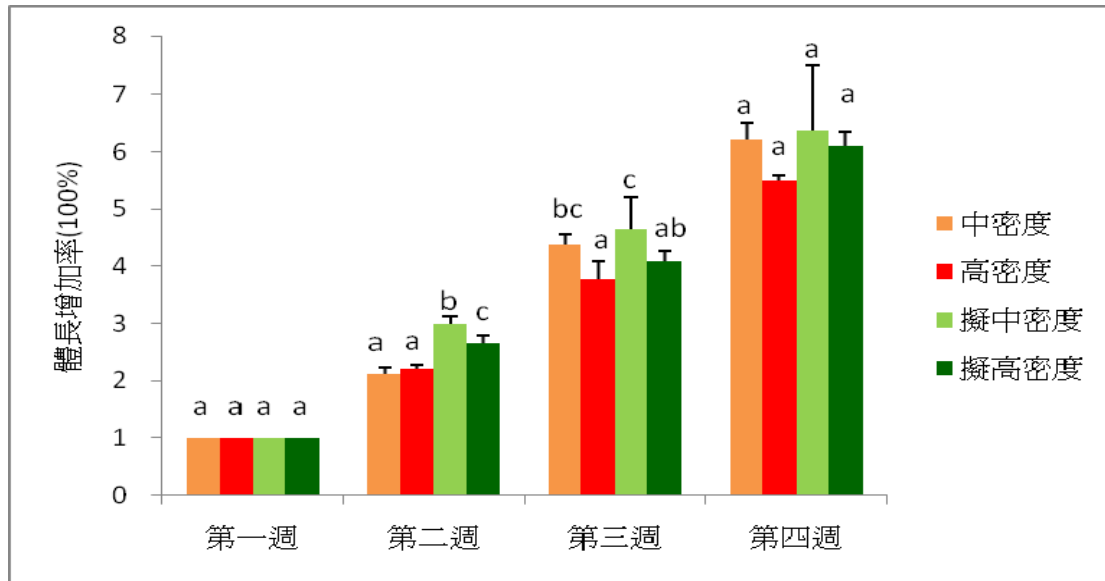
(二)實驗二

由圖四、可以發現，擬中密度組別(一盒五隻蝌蚪加一面鏡子)的生長速度較擬高密度(一盒十隻蝌蚪加一面鏡子)快，再次證明了密度效應的存在，包括在第二週及第三週，第四週則變成沒有顯著差異。



圖四、擬中密度以及擬高密度組蝌蚪的成長曲線

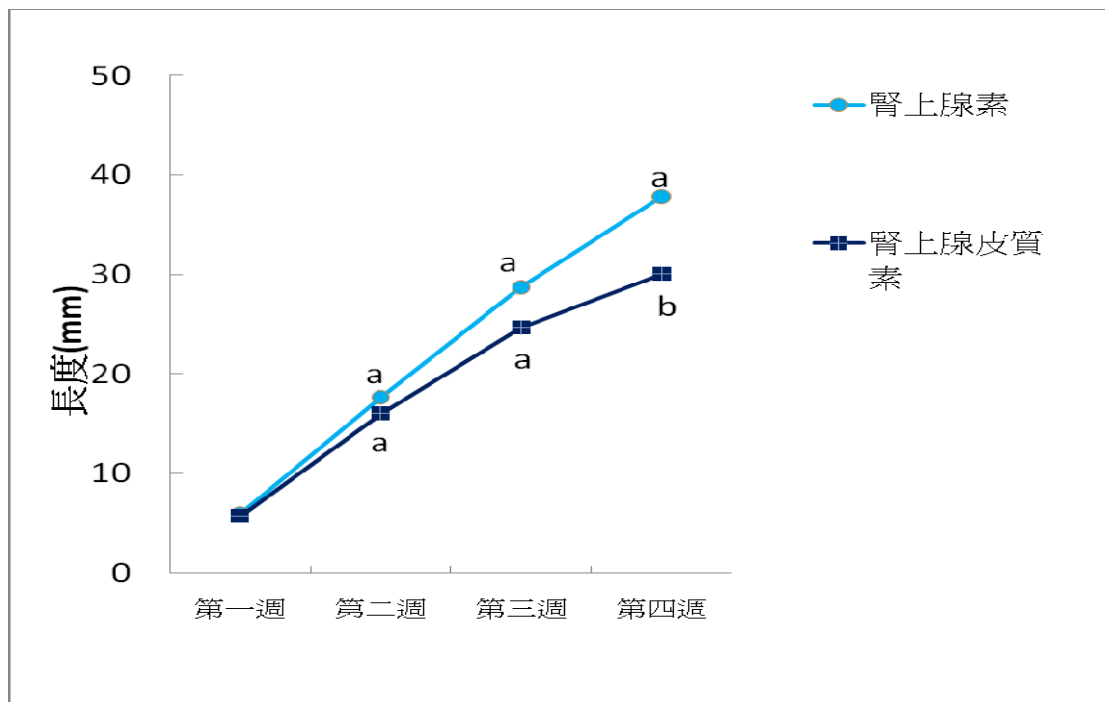
由圖五可發現擬中密度的體長增加率在第三週及第四週時與中密度相同，且擬高密度的生長速度也明顯較原先的中密度快，介於中密度與高密度間，由此可發現鏡子會使蝌蚪以為密度增加了，而降低了原本實際密度下的生長速度，**證實視覺是造成蝌蚪感受密度的器官之一**，也就是蝌蚪會照鏡子！



圖五、擬中密度組、擬高密度組與中密度組及高密度組比較

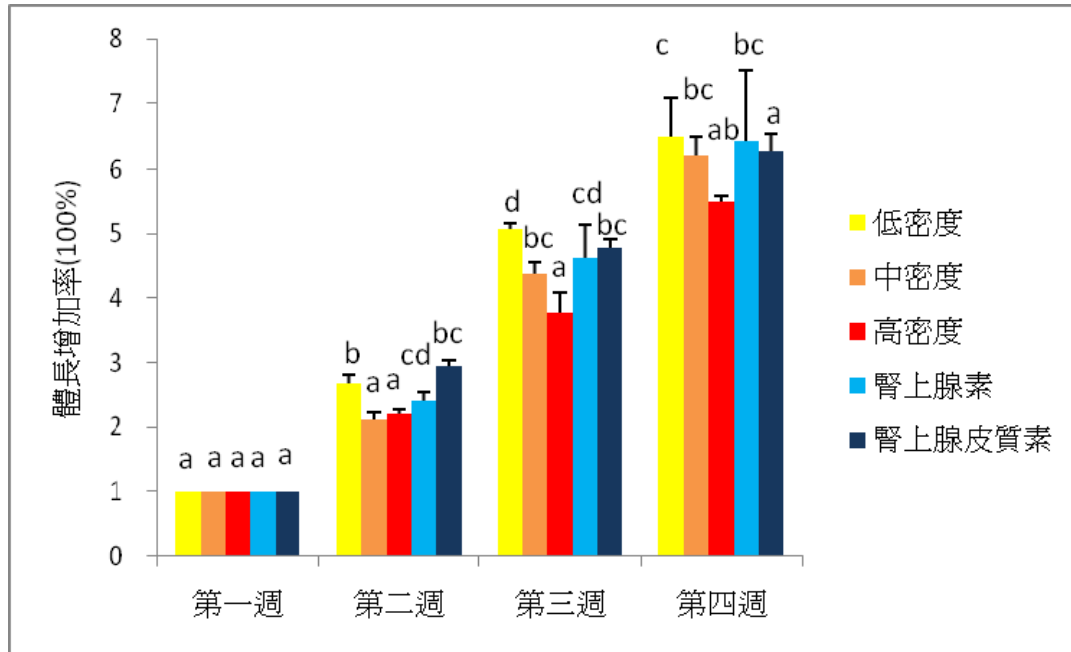
(三)實驗三

此實驗中，在低密度的組別中分別加入腎上腺素以及腎上腺皮質素，可發現不論是添加腎上腺素還是腎上腺皮質素皆會抑制蝌蚪的成長，尤其是以加入腎上腺皮質素的組別在第四週更為明顯（圖六）。



圖六、腎上腺素及腎上腺皮質素處理之組別的蝌蚪成長曲線

腎上腺素以及腎上腺皮質素會讓原本低密度的蝌蚪成長減緩，產生與密度效應相仿的影響，尤其在第三週之後較為明顯，其中腎上腺皮質素的成長與低密度的蝌蚪有達到成長上的顯著差異，暗示著密度效應可能是透過激素來影響蝌蚪的生長。



圖七、腎上腺素及腎上腺皮質素處理之組別與不同密度之比較

陸、討論

密度效應

本研究發現澤蛙蝌蚪的確有密度效應的存在，當密度愈高，即使食物是充足的狀態下，蝌蚪的成長愈緩慢(圖三)。密度增加所造成的過度干擾，可能使個體無法充分休息，使個體成長緩慢。如果在食物充足的情況下，蝌蚪亦維持其密度效應，那蝌蚪勢必有透過某種感覺來察覺週遭的密度變高，有可能是觸覺、嗅覺、或視覺。推敲其過程，其中觸覺可能是當密度變高時，個體之間常常在移動時碰觸到彼此，所以密度效應在觸覺上可能是個體之間不斷干擾的結果；另外密度效應可能是嗅覺（或化學分子）所造成的，這可能是密度較大時，個體排出的代謝廢物之濃度也會隨著增加，

進而影響個體的成長。但前面這兩種密度效應是密度「間接」透過其他過程來影響個體。而如果是視覺引起的密度效應，則是密度直接影響個體的生理機制，這可能是透過內分泌所產生的影響，而這一種感受機制，也是單純的「空間」所引起的密度效應，本研究的視覺實驗也證實澤蛙蝌蚪有這種單純空間上的密度效應。

發展視覺來感受壓力

從實驗二(圖五)發現，當以鏡子來增加盒中蝌蚪視覺上的數量，也會使蝌蚪的成長減緩，且以低密度模擬中密度的組別竟表現的和中密度組別的成長一模一樣，證實澤蛙蝌蚪的密度效應是可以透過視覺來引發的！

另外我們在實驗二的擬高密度組別中雖然成長更緩慢，但並沒有表現出與高密度完全一致的生長情形，可能是因為在蝌蚪看見兩倍蝌蚪數量的同時，鏡面也會放大蝌蚪眼中的生活空間，因此會降低此實驗數據的準確性，使該組蝌蚪的生長情形介於原先的中密度及高密度之間，另外也可能是蝌蚪已經學習到看到並不是真的個體，而減緩密度效應的影響。在第四週擬中密度組與擬高密度組沒有達到顯著差異可能也是這些原因所造成。

澤蛙蝌蚪可能會透過'視覺-內分泌'，來產生密度效應

本研究證實澤蛙蝌蚪的密度效應會經由視覺感受的過程而產生密度效應，我們證實壓力激素會產生與密度效應類似的反應(圖七)，推測澤蛙蝌蚪的密度效應可能是藉由壓力激素而影響成長的速度，因為很多動物在面臨壓力時，體內的腎上腺素或腎上腺皮質素的濃度會明顯增加。

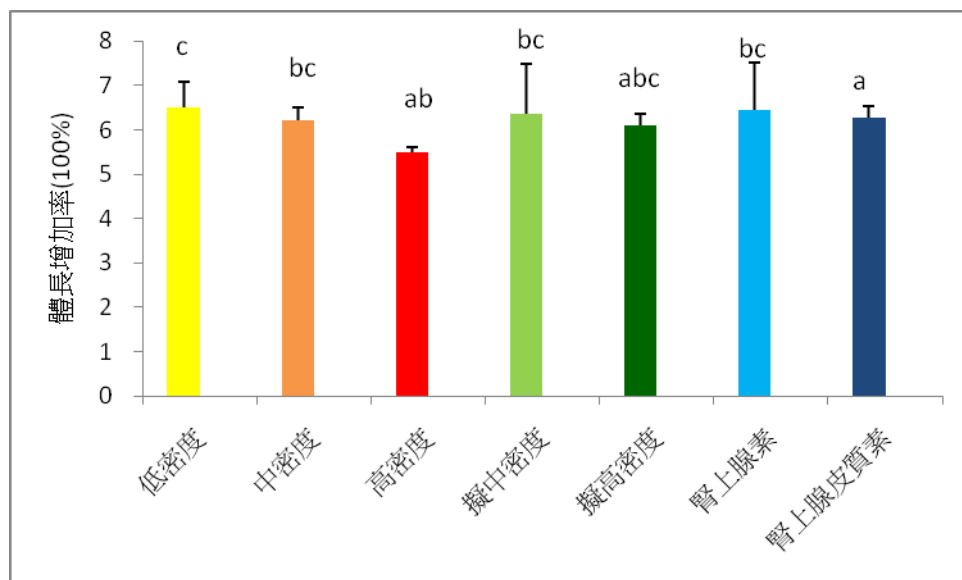
我們預期壓力增加時會使個體產生較多的壓力激素，因此直接在水中添加腎上腺素以及腎上腺皮質素，由於蝌蚪的皮膚很薄，甚至可利用皮膚呼吸，因此我們推測在本研究的實驗三中添加的激素除了藉由鰓吸收，也可能透過皮膚擴散而進入蝌蚪體內，進而影響蝌蚪的成長。

從實驗一及實驗二的結果發現，澤蛙蝌蚪的密度效應是在第三週以後才有顯著影響（圖三、圖五），但添加腎上腺素卻使蝌蚪在第二週就顯著受到影響（圖七），這結果暗示著激素引發密度效應的路徑（分泌、接收或產生反應）要到第三週以後才趨於成熟。

另外發現加入腎上腺皮質素的組別反應比較像高密度，但由於反應可能會受到激素濃度、蝌蚪吸收過程以及不同種類激素的影響，因此不能完全確定蝌蚪在實驗中的反應結果就是受此種兩種壓力激素所調控的。

密度效應會影響變態小蛙的體型

在第四週，也就是蝌蚪變態前的最後一週，蝌蚪的體長依不同處理而有不一樣的成長率(圖八)。這種變態前體型較小可能也會影響到變態成青蛙後的生活，例如變態成小蛙時的體型較大，也代表者有較長的腿以及較多的能量，可以幫忙其追捕獵物或躲避天敵。但本研究僅記錄到變態之前，尚待更進一步的研究方能確認。



圖八、各處理組別在變態前（第四週）的體長增加率

密度效應有不好影響，為何澤蛙仍使用臨時積水來繁殖

將子代產在臨時積水雖然容易產生密度效應，而對蝌蚪不利，但澤蛙還是會將卵產在臨時積水中，可見天擇上一定有其好處勝過密度效應的不良影響，才使得這種行為特徵繼續被保留下來。因為蝌蚪對很多動物來說是美味的食物來源，例如魚類、鳥類、水蠶等，因此澤蛙將卵產在上位有天敵存在的臨時積水中，比較不會有魚類等天敵將未孵化的卵或剛孵化的蝌蚪吃掉，另外我們也發現澤蛙的蝌蚪發育的速度很快，大概一個月內就可以從卵變成小蛙兒離開水源，快速發育的特性可以幫助大部分的蝌蚪在積水乾涸之前變態成小蛙，也可以彌補密度效應所產生的不良影響。

柒、結論

- 一、由於蝌蚪生活於臨時積水，當面臨乾燥少雨的天氣時，生活空間就會變小，而產生密度效應造成其生長速度的減緩。
- 二、視覺為蝌蚪感受外界密度的機制之一。
- 三、密度效應可能是第三週以後由激素影響蝌蚪的成長。
- 四、密度效應可能是動物為了因應環境壓力，將能量重新分配，造成生長速率減緩。

捌、未來展望

雖然本研究探討了澤蛙蝌蚪的密度效應，其視覺感受以及可能的內分泌反應等，但我們對很多問題仍無法有效地回答或解釋，以下是數點值得未來持續去探討的部分，期望能增加我們對密度效應的瞭解：

- 一、本實驗進行了視覺感受過程的研究，也發現了視覺的確是澤蛙蝌蚪會利用的感官系統。而從討論中我們也推測了蝌蚪還有其他的感受機制，如觸覺、化學成分（嗅覺）等，這些未來也值得設計相關的實驗去探

討是否也會使蝌蚪感受到外界密度而產生密度效應。

二、從蝌蚪變態為青蛙似乎是一個新的開始，從水生變成陸生身體經驗非常多的改變，體態與生活方式都截然不同，但這並非一個新生命階段的開始，我們推測青蛙蝌蚪時期的成長仍是會影響變態後成體的表現。

三、動物在感受到壓力的時候，體內會產生腎上腺素或腎上腺皮質素等壓力激素來因應突然的環境變化，我們在實驗三僅發現添加壓力激素時會產生與高密度壓力下相似的反應，仍不足以肯定的了解密度效應是否真的就是透過壓力激素而產生的。未來可以研究在密度增加時，去偵測蝌蚪體內或飼養的環境中有哪些化學物質(激素)會產生變化，這樣便可以確切知道蝌蚪是經由何種激素來產生密度效應。

玖、參考資料

- Alford, R. A. and R. N. Harris. 1988. Effect of larval growth history on anuran metamorphosis. *The American Naturalist*. 131: 91-106.
- Newman, R. A. 1992. Adaptive plasticity in amphibian metamorphosis. *BioScience* 42: 671-678.
- Rot-Nikcevic, I., C. N. Taylor and R. J. Wassersug. 2006. The role of images of conspecifics as visual cues in the development and behavior of larval anurans. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 19-25.
- Semlitsch, R. D., D. E. Scott and J. H. K. Pechmann. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69: 184-192.
- Travis, J. 1984. Anuran size at metamorphosis: experimental test of a model based on intraspecific competition. *Ecology* 65: 1155-1160.

Wilbur, H. M. and J. P. Collins. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182: 1305-1315.

巫奇勳。2008。半淡鹹水環境澤蛙蝌蚪的滲透調節、成長與變態之研究。東海大學生命科學系博士論文。

周文豪。1996。臺灣無尾類蝌蚪之形態、分類與棲境區隔。東海大學生物學系研究所博士論文。

官淑蕙。2004。應用粒線體 DNA D-loop 片段探討彰化地區澤蛙之族群遺傳結構。國立彰化師範大學生物學系碩士論文。

徐苑佐。2009。鹽度對食蟹蛙蝌蚪成長發育及變態特徵的影響。東海大學生命科學系碩士論文。

徐睿伶。2007。低海拔地區人工水池棲地白額樹蛙蝌蚪越冬之研究。東海大學生命科學系碩士論文。

莊銘豐。2006。台灣亞熱帶低海拔地區腹斑蛙蝌蚪越冬之研究。國立彰化師範大學生物學系碩士論文。

劉宛宜。2007。除草劑丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪的影響。東海大學生命科學系碩士論文。

【評語】 040721

- 1.低密度用 5 隻，中密度 10 隻，高密度 20 隻可再重新定義，
比如高密度用 40 隻…。
- 2.腎上腺素或皮質素宜用不同的濃度再試看看。
- 3.所有數據不見用 spss 分析過。