

Иванов Евгений Александрович

ОЦЕНКА БЛАГОПОЛУЧИЯ ПОПУЛЯЦИЙ РЕДКИХ ВИДОВ КОШАЧЬИХ (ТИГРА,
ЛЕОПАРДА И МАНУЛА) В ПРИРОДЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕИНВАЗИВНЫХ
МЕТОДОВ

03.02.04 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук.

Научный руководитель: **Найденко** Сергей Валериевич, к.б.н, ведущий научный сотрудник Лаборатории поведения и поведенческой экологии млекопитающих Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Официальные оппоненты: **Герлинская** Людмила Алексеевна, д.б.н, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии и генетики СО РАН.

Роговин Константин Александрович, д.б.н., старший научный сотрудник Лаборатории популяционной экологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных СО РАН (г. Новосибирск).

Защита диссертации состоится 17 декабря 2013 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.213.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Институте экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН по адресу 119071, г.Москва, Ленинский просп., д.33.

Тел./факс: 8(495)952-35-84, email: admin@sevin.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу 119071, г. Москва, Ленинский просп., д.33.

Автореферат разослан 15 ноября 2013 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

к.б.н. Кацман Елена Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Сохранение биоразнообразия является одним из основных вопросов современной биологии (Павлов и др., 2009; Sutherland et al., 2013). Задача сохранения животных в природе требует глубоких теоретических знаний об объекте исследований. В первую очередь – выявления факторов, критических для существования популяции. Особенно это важно для редких малочисленных видов, подвидов и популяций. Амурский тигр (*Panthera tigris altaica*) и дальневосточный леопард (*P. pardus orientalis*) – крайне редкие подвиды крупных кошачьих, численность которых в природе составляет 450 и 30-50 особей соответственно (Miquelle et al., 2007; Jackson, Nowell, 2008). Численность манула (*Otocolobus manul*) в России также невелика – около 4000 особей (Кирилук, Пузанский, 2000; Barashkova et al., 2007). Все три вида внесены в Красную Книгу Российской Федерации и красный список Международного Союза Охраны Природы (IUCN). Сохранение этих видов в естественной среде требует всестороннего изучения их биологии. Важную роль играет оценка благополучия их популяций (устойчивости популяций под воздействием внешних факторов), которой в настоящее время уделяется большое внимание. На уровень глюкокортикоидов существенное влияние оказывают условия окружающей среды. Это обстоятельство позволяет широко использовать его в качестве критерия благополучия животных как в неволе, так и в природе (Broom, 1991).

В ситуации, когда непосредственные встречи и наблюдения за животными практически невозможны, наиболее перспективными становятся методы исследований, не требующие непосредственных контактов с животными. Очень информативным является анализ экскрементов животного, собранных в природных условиях (Bechert, 2012). Он позволяет получить сведения о генетическом разнообразии популяции, половой и видовой принадлежности особи (Sugimoto et al., 2006; Рожнов и др., 2011), питании (Klare et al., 2011), зараженности различными паразитами (Elmore et al., 2013). Кроме того, разработаны методы оценки гормонального статуса животных по концентрации гормонов и их метаболитов в экскрементах (Герлинская и др., 1993; Palme, 2005). Использование экскрементов позволяет избежать необходимости отлова животных и связанного с этим стресса, а так же получить относительно большое количество образцов. Однако использование экскрементов для оценки гормонального статуса требует разработки и валидации методики отдельно для каждого вида.

Использование неинвазивных методов оценки гормонального статуса позволяет оценивать благополучие животных непосредственно в природе и выявлять негативное влияние различных факторов: абиотических (Huber et al., 2003, Frigerio et al., 2004), биотических (Moshkin et al., 2001; Creel, 2001, 2005; Роговин и др., 2006) и антропогенных (Wasser et al., 1997; Van Meter et al., 2009; Creel et al., 2013). Оценка уровня половых гормонов позволяет определить долю репродуктивно активных животных в популяции, выявить беременных самок (Wasser, Hunt, 2005; Burgess et al., 2012).

Исследования популяций диких кошачьих в природе с использованием неинвазивных методов оценки гормонального статуса проводились пока лишь в единичных случаях, причём рассмотрены были только отдельные аспекты биологии вида. На данный момент такие работы проведены только для гепарда (*Acinonyx jubatus*) (Terio et al., 2004), канадской рыси (*Lynx canadensis*) (Fanson et al., 2012), льва (*Panthera leo*) (Creel et al., 2013) и, частично, для манула (Brown et al., 2005). Тигр, леопард и манул ведут скрытный образ жизни, изучение и отлов их в природе крайне затруднены, и использование неинвазивных методов исследования является перспективным для оценки благополучия особей в природе. Применение данного метода позволяет оценить факторы, которые оказывают наибольшее влияние на благополучие животных в природе и оптимизировать стратегии сохранения амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула.

Цель работы: оценить благополучие и репродуктивные параметры популяций редких видов кошачьих (амурского тигра, дальневосточного леопарда, манула) в природе с помощью неинвазивных методов.

Для достижения цели работы были поставлены следующие задачи:

1. Валидировать методику неинвазивной оценки гормонального статуса амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула для использования её в природе.
2. Оценить сезонную динамику уровня глюкокортикоидов у тигра, леопарда и манула в неволе.
3. Сопоставить уровень глюкокортикоидов у животных в неволе и природных популяциях у тигра, леопарда и манула.
4. Выявить факторы, влияющие на изменение уровня глюкокортикоидов у амурского тигра.
5. Оценить возможность неинвазивной диагностики репродуктивного состояния самок у тигра и леопарда в природе.

Научная новизна

В настоящей работе впервые с использованием неинвазивных методов оценки уровня глюкокортикоидов было проанализировано влияние биотических, абиотических и антропогенных факторов на благополучие амурского тигра в природе. В результате долговременного мониторинга уровня глюкокортикоидов было выявлено влияние сезона на уровень глюкокортикоидов в течение года для тигров и леопардов, но не для манула, содержащихся в неволе. Впервые для представителей семейства кошачьих, на примере амурского тигра, было показано влияние температуры воздуха на изменение уровня глюкокортикоидов как в неволе, так и в природе. В рамках данного исследования, впервые были получены данные о влиянии доступности пищевого ресурса на уровень глюкокортикоидов у дальневосточного леопарда в природе. Также, на примере амурского тигра и дальневосточного леопарда были показаны различия в уровне глюкокортикоидов между животными, содержащимися в неволе, но с разной степенью экспозиции посетителям. В рамках данного исследования была показана возможность оценки количества репродуктивно активных самок амурского тигра и дальневосточного леопарда в природе на основе неинвазивной оценки уровня прогестерона у животных.

Теоритическая и практическая значимость работы

Отработанные в природе методы неинвазивной оценки гормонального статуса важны для понимания процессов, происходящих в популяциях редких видов животных. Данные методы могут быть использованы для проведения мониторинга состояния популяций диких кошачьих, оценки репродуктивного статуса самок и анализа воздействия различных факторов на благополучие особей в природе, что необходимо для разработки подходов к сохранению природных популяций амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула. Кроме того, он может быть использован для оптимизации содержания животных в зоопарках и питомниках, в том числе для контроля мероприятий по обогащению среды. Полученные данные используются при чтении лекционных курсов студентам Российского государственного аграрного университета - МСХА им. К.А. Тимирязева и кафедры зоологии позвоночных Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Уровень глюкокортикоидов может быть использован для оценки благополучия животных.
- 2) Температуру воздуха необходимо учитывать для достоверной оценки влияния различных факторов на благополучие диких кошачьих на дальнем востоке.
- 3) Уровень прогестерона может быть использован для определения репродуктивного потенциала популяций кошачьих в природе.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на конференциях молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН «Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых» (Москва 2010, 2012); международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2011» (Москва, 2011); международной научно-практической конференции «Амурский тигр в Северо-восточной Азии: проблемы сохранения в XXI веке» (Владивосток, 2010); международном совещании «Терофауна России и сопредельных территорий» (Москва, 2010) и на международной конференции «First annual meeting of ISWE» (Цинциннати, 2010).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, из них 1 в издании, рекомендованном ВАК.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в сборе образцов на Дальнем Востоке России. Автор лично провёл процедуры экстракции и измерения концентрации метаболитов гормонов. Анализ всех полученных данных полностью проведён лично автором.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 6 глав (обзор литературы; материал и методы; сезонная динамика уровня глюкокортикоидов у тигра, леопарда и манула в неволе; сопоставление уровня глюкокортикоидов у амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула в природе и неволе; влияние различных факторов на уровень глюкокортикоидов у тигра, леопарда и манула; оценка репродуктивной активности самок амурского тигра и дальневосточного леопарда в природе), выводов и списка цитируемой литературы. Материал изложен на 127 страницах. Работа содержит 28 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 245 наименований, из них 209 на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении дана краткая характеристика темы, поставлены цели и задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы подробно описаны функции стероидных гормонов: глюкокортикоидов и прогестерона. Рассмотрены подходы к оценке благополучия и репродуктивной активности животных по уровню этих гормонов. Рассмотрены и проанализированы методы оценки гормонального статуса. Подробно обсуждены методы неинвазивной оценки гормонального статуса по концентрации гормонов и их метаболитов в экскрементах. Дано краткое описание биологии амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1. Методика сбора образцов и данных

2.1.1. Сбор образцов в неволе

В неволе образцы экскрементов еженедельно собирали в Зоопитомнике Московского зоопарка, расположенном под г. Волоколамском в Московской области (далее – Волоколамск), в период с января 2008 года по декабрь 2009 года и в Новосибирском зоопарке, расположенном в г. Новосибирске (далее – Новосибирск), в период с октября 2010 года по декабрь 2011 года. В среднем от каждого зверя было собрано 4 образца в каждый месяц (табл. 1). Для каждого образца было известно, от какого зверя он получен.

Таблица 1. Количество и пол животных из неволи, использованных в работе (в скобках указано количество образцов).

	Волоколамск			Новосибирск		
	♂	♀	Всего	♂	♀	Всего
Тигр	3	3	6 (237)	1	1	2 (123)
Леопард	3	3	6 (162)	3	2	5 (62)
Манул	1	5	6 (186)	-	-	-

2.1.2. Сбор образцов в природе

Образцы экскрементов амурского тигра в природе были собраны в зимний период в 2008 – 2011 годах в ходе ежегодных полевых работ по изучению амурского тигра на Дальнем Востоке на 7 учётных площадках (табл. 2). Сбор образцов в зимний период позволил обеспечить наилучшую сохранность экскрементов.

Таблица 2. Количество образцов экскрементов амурского тигра, собранных в природе в разное время.

год	2008	2009		2010			2011		
месяц	I	I	II	I	II	III	I	II	III
Уссурийский заповедник	3	8	24	4	6	4	6	12	-
Юго-Запад Приморья	-	-	-	-	15	7	-	10	-
Лазовский заповедник	-	-	-	-	-	-	41	46	19
Удэгейская легенда	-	-	-	-	3	-	-	-	-
Р. Дурмин	-	-	-	-	25	-	-	-	-
Матайский заказник	-	-	-	-	7	-	-	-	-
Ануйский национальный парк	-	-	-	4	11	5	-	-	-

Индивидуальная идентификация образцов экскрементов амурского тигра и дальневосточного леопарда была проведена в кабинете методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН П.А. Сорокиным (Рожнов и др., 2009; Сорокин и др., 2010).

Индивидуально распознаны были образцы экскрементов тигров, собранные в феврале и марте 2010 года. По образцам, собранным в феврале, было идентифицировано 16 тигров на 5 учётных площадках; в марте – 5 тигров на 3 площадках. В дальнейшем для анализа были использованы только образцы, собранные в феврале 2010 года (табл.3.) Для дальневосточного леопарда были индивидуально идентифицированы образцы, собранные в феврале и марте 2010 года и феврале 2011 года на Юго-Западе Приморья. При этом, в 2010 году было идентифицировано 3 образца от 3 разных животных, а в 2011 году – 15 образцов от 7 животных. В анализе использовались только данные за февраль 2011 года (табл.3).

Таблица 3. Количество животных идентифицированных с помощью молекулярно-генетических методов. В скобках указано количество образцов.

тигр						леопард
	место сбора					
Пол животных	Юго-Запад Приморья	нац. парк Удэгейская легенда	р. Дурмин	Матайский заказник	Аньюйский нац. Парк	Юго-Запад Приморья
♂	1 (1)	1 (2)	2 (10)	-	2 (2)	3 (8)
♀	2 (2)	1 (1)	4 (7)	2 (2)	1 (1)	4 (7)

Образцы экскрементов от манулов в природе были собраны в Даурском заповеднике Е.В. Павловой при отлове животных и возле нор известных зверей (Павлова и др., 2011). Таким образом, все образцы экскрементов были идентифицированы. Всего было собрано 14 образцов от 8 манулов.

От каждой собранной в природе пробы отбирались навески экскрементов, этикетировались (вид, пол, номер животного, дата и место сбора (GPS-координаты)) и упаковывались в отдельный чистый полиэтиленовый пакет.

Для определения влияния абиотических факторов на основании архивов метеонаблюдений с ближайшей к месту сбора экскрементов метеостанции рассчитывали среднемесячную температуру и глубину снежного покрова в период сбора образцов. Были использованы данные со следующих метеостанций: Уссурийский заповедник – метеостанция Тимирязевский (WMO ID 31961); Юго-Запад Приморья – метеостанция Барабаш (WMO ID 31971); Лазовский заповедник – метеостанция Лазо (WMO ID 31986); нац. парк Удэгейская легенда – метеостанция Мельничное (WMO ID 31895); Р. Дурмин – метеостанция Гвасюги (WMO ID 31801); Аньюйский нац. парк – метеостанция Троицкое (WMO ID 31655); зоопитомник Московского зоопарка – метеостанция Волоколамск (WMO ID 27502); Новосибирский зоопарк – метеостанция Обская ГМО (WMO ID 29635).

Архивы метеонаблюдений были взяты с сайта [rp5.ru](http://www.rp5.ru) (<http://www.rp5.ru>).

В качестве антропогенных факторов из ежегодных отчётов Росстата по Хабаровскому и Приморскому краям были взяты следующие показатели для района, на территории которого находится площадка мониторинга: численность населения района, чел; численность городского населения

района, чел; численность сельского населения района, чел; плотность населения, чел/км²; плотность сельского населения, чел/км²; поголовье крупного рогатого скота, шт.; посевные площади всех сельскохозяйственных культур, га; процент обрабатываемых земель; выбросы загрязняющих веществ в атмосферу от стационарных источников за год, тыс. тонн; количество стационарных источников выбросов, шт.; протяженность автодорог общего пользования местного значения, находящихся в собственности муниципальных образований на конец года, км.

Плотность населения и процент обрабатываемых земель рассчитывали, исходя из площади района. Поскольку Уссурийский заповедник находится на границе Шкотовского и Уссурийского районов, для него рассчитывали среднее значение между показателями этих районов.

В качестве биотических факторов использовали следующие показатели, полученные Миккелом с соавторами (Miquelle et al., 2011) по результатам ежегодных зимних маршрутных учётов амурского тигра на Дальнем Востоке: плотность следов тигра, следов на 10км маршрута; плотность тигров на основании экспертной оценки, тигров на 100км²; плотность следов изюбря, следов на 10км маршрута; плотность следов пятнистого оленя, следов на 10км маршрута; плотность следов косули, следов на 10км маршрута; плотность следов кабана, следов на 10км маршрута; суммарная плотность следов копытных, следов на 10км маршрута.

Для расчёта суммарной плотности следов копытных суммировали плотность следов изюбря, пятнистого оленя, косули и кабана.

2.2. Определение концентрации метаболитов гормонов

Все образцы экскрементов замораживали после сбора и доставляли на Научно-экспериментальную базу «Черноголовка» ИПЭЭ РАН, где хранили при температуре -18°C до проведения анализа.

Экстракцию образцов проводили по методике описанной Евгенов с соавторами (Jewgenow et al., 2006) с использованием 90% метанола. Концентрацию метаболитов глюкокортикоидов и прогестерона в экскрементах измеряли методом гетерогенного иммуноферментного анализа. Для этого использовали коммерческие наборы компании «Иммунотех» (Москва, Россия): «Иммуно-ФА Кортизол» и «Иммуно-ФА ПГ» соответственно. Все процедуры проводились в соответствии с инструкцией к набору.

Данная методика измерения концентрации метаболитов глюкокортикоидов была валидирована в нашей лаборатории для амурского тигра (Найденко и др., 2011), манула и леопарда несколькими методами (табл. 4).

Таблица 4. Методы валидации неинвазивной методики оценки уровня глюкокортикоидов, применённые для исследуемых видов.

	Иммунохроматография	Физиологическая	Биологическая
Тигр	+	+	+
Леопард	+	+	+
Манул	-	-	+

2.3. Валидация методов неинвазивной оценки уровня гормонов

В разделе подробно описаны все процедуры валидации используемых методов неинвазивной оценки уровня глюкокортикоидов и прогестерона, проведённые для амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула. Отдельные разделы посвящены радиометаболизму и иммунохроматографии, АКТГ-тесту и биологической валидации.

2.4. Статистическая обработка данных

Распределение в выборке концентраций метаболитов гормонов не отвечало критериям нормального распределения у всех трёх видов, поэтому для обработки использовали непараметрические критерии. Все подвыборки, содержавшие меньше трёх значений, исключались из общей выборки.

Для выявления сезонной динамики уровня глюкокортикоидов у амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула рассчитывали медианное значение концентрации метаболитов глюкокортикоидов за каждый месяц для каждого животного в отдельности, затем полученные выборки для каждого месяца сравнивали между собой с помощью критерия Фридмана. Для сравнения уровней глюкокортикоидов у самцов и самок амурского тигра, и дальневосточного леопарда, а также между тиграми и леопардами из Волоколамска и Новосибирска рассчитывали медианное значение концентрации метаболитов глюкокортикоидов за каждый месяц для каждого животного в отдельности, затем для группы животных (по полу или месту содержания). Полученные значения сравнивали между собой как две выборки, связанные по месяцам, с помощью критерия Вилкоксона для

сопряженных пар. Для определения влияния абиотических факторов на амурского тигра выборка собранных в природе образцов была разбита на отдельные группы сначала по месту сбора образцов, затем по году и месяцу. Затем рассчитывали медианное значение концентрации метаболитов глюкокортикоидов для каждого месяца. В неволе рассчитывали медианное значение концентрации метаболитов глюкокортикоидов за месяц в экскрементах каждого животного в отдельности, затем для всех животных в данном месте содержания. Для определения влияния глубины снежного покрова и среднемесячной температуры на уровень глюкокортикоидов у животных рассчитывали коэффициент корреляции Спирмана. Для определения влияния антропогенных и биотических факторов на амурского тигра выборка была разбита по месту сбора образцов и году сбора. Рассчитывали медианное значение для каждого года. Затем рассчитывали коэффициент корреляции Спирмана. Для сравнения уровней гормонов у тигров и леопардов из природы и неволи были использованы только идентифицированные образцы из природы, собранные в феврале (на этот месяц приходится наибольшее количество идентифицированных образцов, собранных в природе). Для каждого животного рассчитывали медианное значение концентрации метаболитов глюкокортикоидов за февраль. Полученные значения для неволи и природы сравнивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Глава 3. Сезонная динамика уровня глюкокортикоидов у кошачьих в неволе

3.1. Амурский тигр и дальневосточный леопард

Концентрация метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах амурских тигров из Новосибирска была достоверно выше ($1095,2 \pm 143,4$ нг/г), чем у тигров из Волоколамска ($391,7 \pm 18,9$ нг/г) (критерий Вилкоксона: $T=0$, $Z=3,05$; $n_1=12$; $n_2=12$; $p=0,002$). Различалась и динамика изменения уровня глюкокортикоидов у амурских тигров из двух зоопарков. У тигров из Волоколамска концентрация метаболитов глюкокортикоидов изменялась в течение года незначительно (520 нг/г в январе и 297 нг/г в сентябре) (Рис. 1), в то время как у зверей из Новосибирска она изменялась в широких пределах от $1804,8$ нг/г в феврале до $426,9$ нг/г в июне.

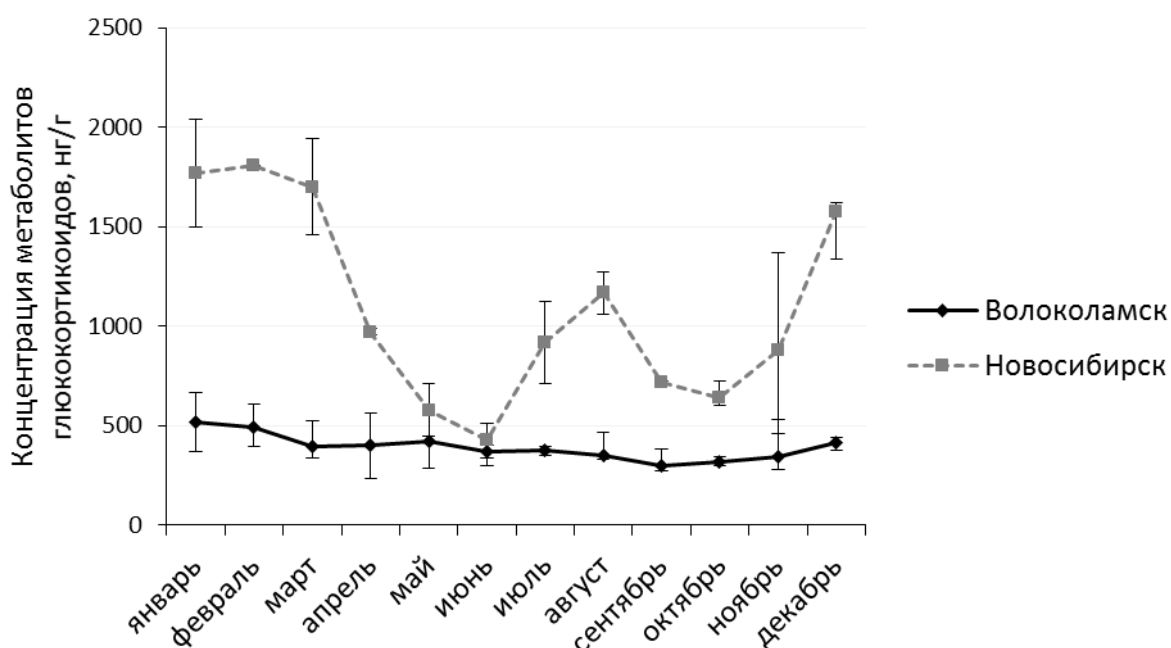


Рисунок 1. Изменения концентрации метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах тигров из Волоколамска (n=6) и Новосибирска (n=4) в течение года (медиана и межквартильный интервал).

У леопардов уровень глюкокортикоидов значительно изменялся в течение года. Минимальная концентрация метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах леопардов была отмечена в феврале и составила $212,2 \pm 12,5$ нг/г; максимальная – в августе – $991,6 \pm 314,9$ нг/г.

У леопардов из Новосибирска уровень глюкокортикоидов был значительно выше, чем у зверей из Волоколамска (критерий Вилкоксона: $T=0$; $Z=2,2$; $n_1=6$; $n_2=6$; $p=0,027$).

Условия содержания животных в Новосибирске и Волоколамске значительно различались. В нашей работе мы можем выделить два основных отличия. Во-первых, в Новосибирске звери постоянно находились на экспозиции и ежедневно сталкивались с большим количеством посетителей. Питомник в Волоколамске, напротив, предназначен для содержания и разведения диких животных, поэтому он закрыт для регулярного посещения. Посетители считаются одним из основных источников стресса для животных в зоопарках (Morgan, Tromborg, 2007). Для многих видов показано влияние увеличения числа посетителей как на поведение, так и на уровень глюкокортикоидов у животных (Wielebnowski et al., 2002; Davis et al., 2005; Carder, Semple, 2008; Pifarré et al., 2012). Степень влияния посетителей при этом зависит от общего благополучия животных, конструкции вольер и

применяемых методик обогащения среды (Davis et al., 2005; Carder, Semple, 2008).

Во-вторых, различалась среднемесячная температура воздуха в зимний период в Новосибирске и Волоколамске в исследуемые годы. В Новосибирске она была ниже на 5–10 градусов. При этом именно в зимний период (с ноября по март) были выявлены различия в уровне глюкокортикоидов у тигров и леопардов из Волоколамска и Новосибирска. В летний период (с апреля по сентябрь) среднемесячные температуры практически не различались, и уровень глюкокортикоидов у тигров из Новосибирска и Волоколамска также был сходным (подробнее вопрос влияния температуры на уровень глюкокортикоидов рассмотрен в разделе 5.1.2). В данном случае наиболее вероятно, что оба эти фактора (температура воздуха и постоянная экспозиция животных) действовали совместно, влияя на уровень глюкокортикоидов у тигров и леопардов. Поэтому уровень глюкокортикоидов у амурских тигров и дальневосточных леопардов именно в Волоколамске, где доступ посетителей был закрыт, следует рассматривать как «базальный» для обоих подвидов и сравнивать с таковым в природе.

3.2. Манул

У манулов, содержащихся в Волоколамске, уровень глюкокортикоидов не изменялся достоверно в течение года (для периода с апреля по декабрь; критерий Фридмана: $T=9,38$; $n=5$; $p=0,93$). В среднем за год концентрация метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах манулов составляла $1007,5 \pm 45,4$ нг/г.

Для многих видов кошачьих показано отсутствие сезонной динамики в уровне глюкокортикоидов. Поскольку уровень глюкокортикоидов является отражением затрат на приспособление к различным внешним факторам, можно предположить, что влияние таких факторов на манула было постоянным. Сезонные колебания в силе воздействия некоторых из этих факторов (например, температуры воздуха) не оказывали существенного влияния на животных.

Глава 4. Сопоставление уровня глюкокортикоидов у животных в природе и неволе.

4.1. Амурский тигр и дальневосточный леопард

Концентрация метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах амурских тигров из природы ($n=16$, $959,9 \pm 248,2$ нг/г) и из Волоколамска ($n = 6$, $496,1 \pm 68,1$ нг/г) в феврале достоверно не различалась (критерий Манна-Уитни: $Z=0,99$; $n_1=16$; $n_2=6$; $p=0,32$). При этом, большой разброс значений в выборке из природы говорит о том, что у некоторых животных в природе уровень глюкокортикоидов был значительно выше, чем у животных из неволи (рис. 2).

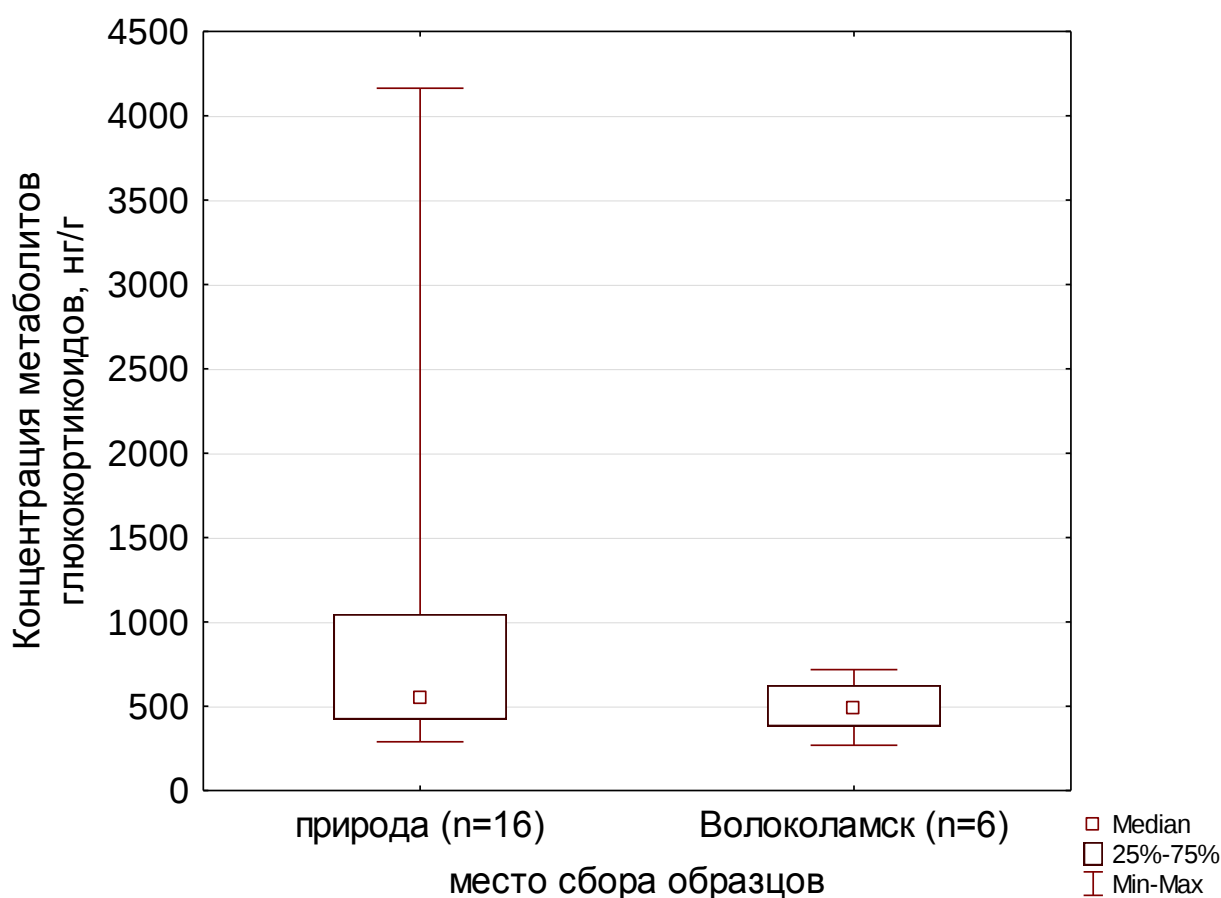


Рисунок 2. Уровень глюкокортикоидов у амурских тигров в неволе и в природе.

У дальневосточных леопардов из природы ($n=7$) концентрация метаболитов глюкокортикоидов в феврале ($1137,3 \pm 353,7$ нг/г) была достоверно выше, чем у животных из Волоколамска ($n=5$) в тот же период ($216,2 \pm 12,4$ нг/г) (критерий Манна-Уитни: $Z=2,27$; $n_1=7$; $n_2=5$; $p=0,022$). Более высокий уровень глюкокортикоидов у животных в природе может быть напрямую связан с их более высокой локомоторной активностью, а

следовательно дополнительными энергозатратами, вызванными необходимостью добывания корма.

4.2. Манул

Концентрации метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах манулов из природы и из Волоколамска в период с февраля по март достоверно различались (критерий Манна-Уитни: $Z=2,63$; $n_1=4$; $n_2=8$; $p=0,008$) и составляли $448,7 \pm 46,2$ нг/г и $1076 \pm 142,3$ нг/г, соответственно (рис. 3). Таким образом, уровень глюкокортикоидов у манулов в природе был значительно ниже, чем у манулов в Волоколамске.

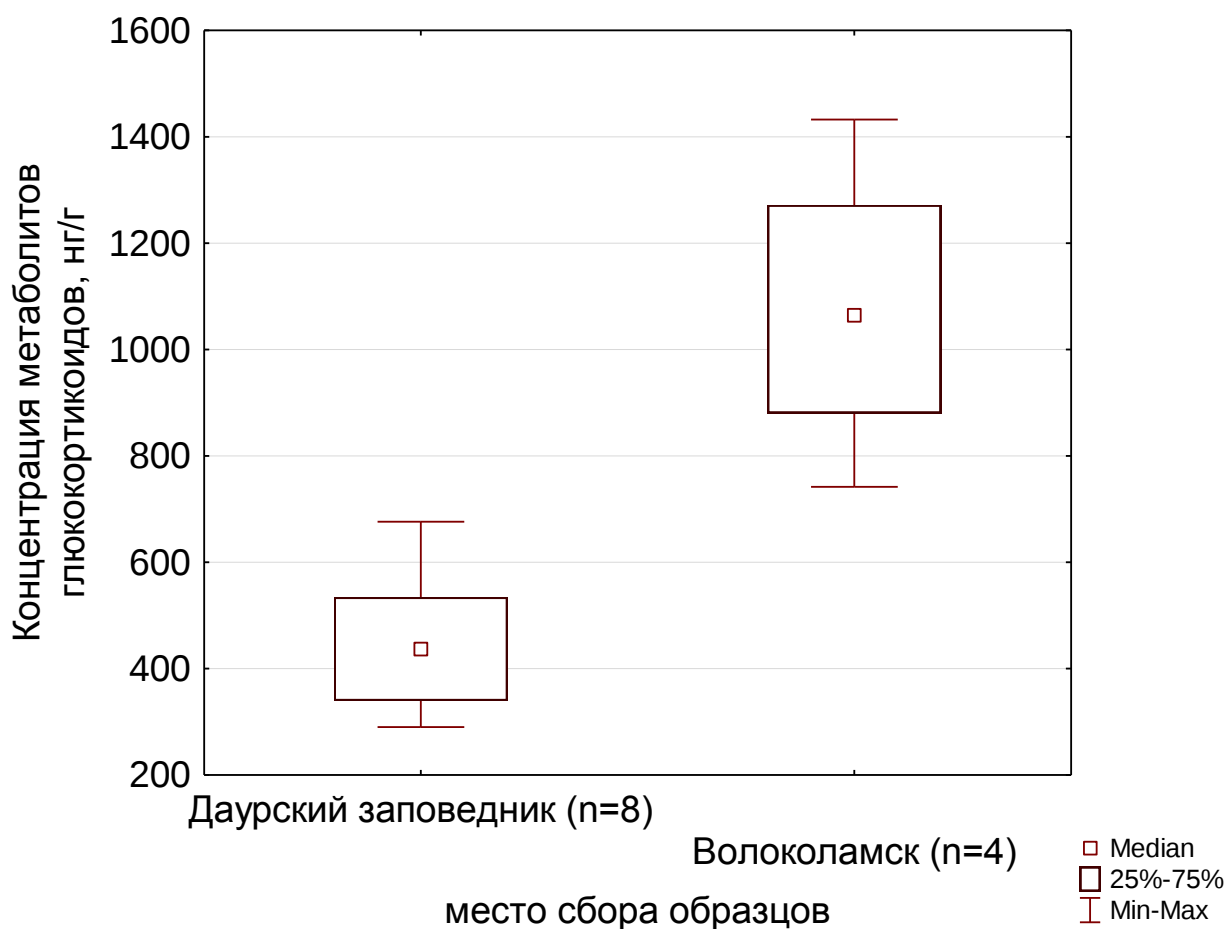


Рисунок 3. Уровень глюкокортикоидов у манулов в неволе и в природе.

Наиболее вероятная причина этих различий – условия содержания. Несмотря на то, что манулы в Волоколамске содержались без доступа посетителей, условия в целом могли быть неблагоприятными для манулов. В частности, животные содержались в непосредственной близости от более крупных хищных (красного волка *Cuon alpinus*), что может вести к увеличению уровня глюкокортикоидов у более мелких хищников (Wielebnowski et al., 2001). Все манулы в Волоколамске были носителями токсоплазмоза

(Альшинецкий М.В, личное сообщение). Манул крайне чувствителен к этому заболеванию, встречаемость которого среди диких кошек в природе крайне низка (Brown et al., 2002, 2005).

Глава 5. Влияние различных факторов на уровень глюкокортикоидов у амурского тигра.

5.1. Влияние абиотических факторов

5.1.1. Глубина снежного покрова

Глубина снежного покрова часто описывается в литературе как фактор, оказывающий значительное влияние на животных, в том числе на их перемещения и добывание корма (Формозов, 1990).

Хотя среднемесячная глубина снежного покрова на разных учётных площадках колебалась от 0,2 см на Юго-Западе Приморья (март 2011 года) до 54 см в Анюйском национальном парке (март 2010 года), нами не было обнаружено корреляции между глубиной снежного покрова и уровнем глюкокортикоидов у амурских тигров (коэффициент Спирмана: $r=-0,25$; $n=19$; $p=0,3$).

Известно, что глубокий снежный покров может значительно затруднять передвижение и добычу пищи для копытных (Parker et al., 1984; Маслов, Ковалёв, 2013). Для хищных, в том числе кошачьих, глубокий снег также может быть фактором, затрудняющим перемещение и охоту (Формозов, 1990). Однако, негативное влияние этого фактора на крупных кошачьих значительно меньше. Так, тигр не зависит от источников корма, которые могут быть скрыты под глубоким снегом, а для перемещений выбирает малоснежные места, тропы других животных и дороги (Юдаков, Николаев, 2012). Более того, негативное влияние, которое снежный покров оказывает на копытных, может облегчать их добычу для тигра. Так, при высоте снежного покрова в 50 см, успешность охоты амурского тигра на кабана возрастает почти в полтора раза (Юдаков, Николаев, 2012). Показано также, что доля кабана в рационе тигра достигает максимума именно зимой (Микелл и др., 2005).

5.1.2. Температура воздуха

В неволе изменения в концентрации метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах амурских тигров из Новосибирска достоверно отрицательно коррелировали с изменениями среднемесячной температуры воздуха (коэффициент Спирмана: $r=-0,75$; $n=12$; $p=0,005$). У тигров из Волоколамска

наблюдалась сходная тенденция (коэффициент Спирмана: $r=-0,55$; $n=12$; $p=0,06$).

В природе уровень глюкокортикоидов у амурских тигров в Уссурийском заповеднике в зимний период отрицательно коррелировал с температурой воздуха (коэффициент Спирмана: $r=-0,76$; $p=0,028$; $n=8$) (рис. 4).

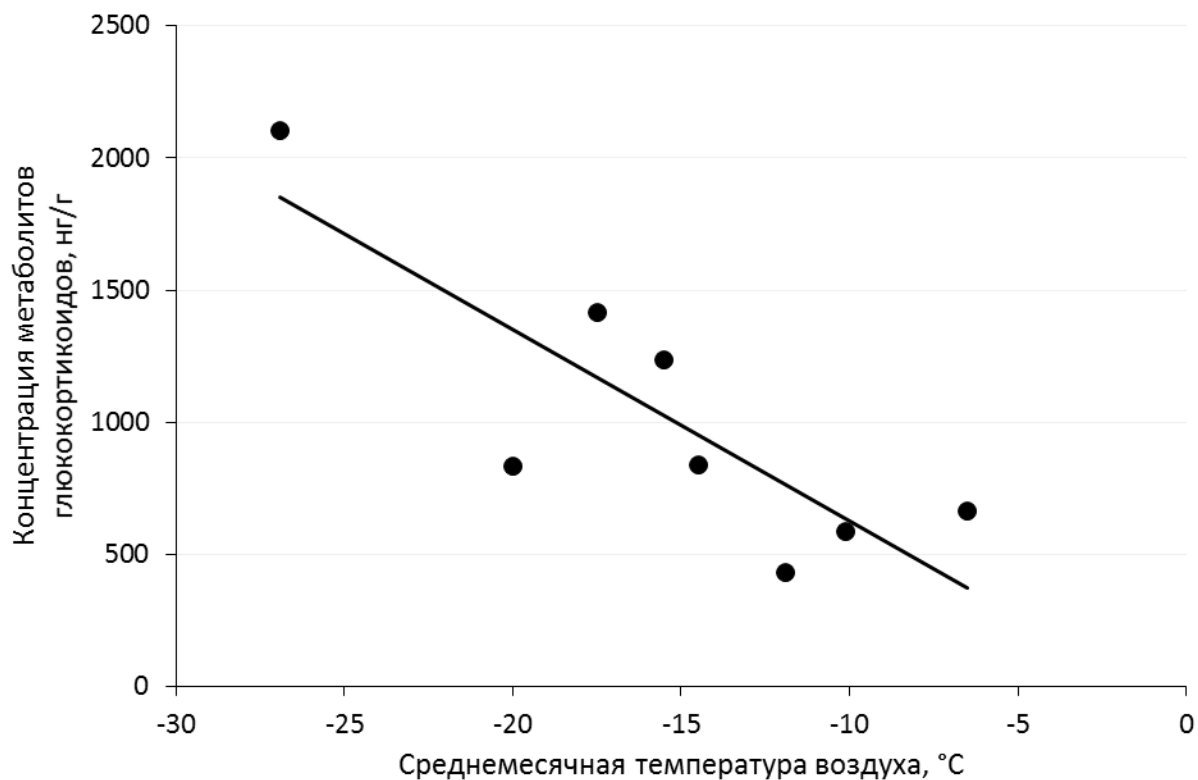


Рисунок 4. Корреляция среднемесячной температуры воздуха и уровня глюкокортикоидов у тигров в Уссурийском заповеднике.

Поддержание постоянной температуры тела в условиях низких температур требует наличия целого ряда морфологических, физиологических и поведенческих адаптаций. Мех животных выполняет важнейшую функцию в приспособлении к низким температурам (Steudel et al., 1994; Rymer et al., 2007). Плотность зимнего меха у амурского тигра и дальневосточного леопарда относительно невелика и не превышает 3000 волосяных луковиц на 1 см^2 кожи, что втрое меньше, чем у евразийской рыси (*Lynx lynx*) – одного из самых приспособленных к низким температурам вида кошачьих (Гептнер, Слудский, 1972). Наши данные показывают, что для поддержания постоянной температуры тела при низких температурах амурскому тигру могут потребоваться повышенные энергозатраты.

Повышение уровня глюкокортикоидов ведёт к ускорению энергетического обмена, стимулирует процессы катаболизма гликогена,

жиров и белков (Brillon et al., 1995; Christiansen et al., 2007). Именно интенсификация обмена веществ ведёт к увеличению выработки эндогенного тепла. Таким образом, высокий уровень глюкокортикоидов у амурского тигра в зимний период, вероятно, напрямую связан с терморегуляцией.

Хотя для большей части площадок мониторинга амурского тигра, расположенных в разных частях ареала, наблюдалась тенденция к повышению уровня глюкокортикоидов с понижением среднемесячной температуры воздуха, в целом, для всей выборки проб из природы, достоверной корреляции выявлено не было (коэффициент Спирмана: $r=-0,28$; $n=19$; $p=0,23$). По-видимому, кроме температуры на уровень глюкокортикоидов у амурского тигра оказывали влияние и иные факторы. Так, у животных из менее населенной северной части ареала (национального парка «Удэгейская легенда», верховий р. Дурмин, Анюйского национального парка) уровень глюкокортикоидов при сходной температуре воздуха был в целом несколько ниже, чем у животных из более населенной южной части ареала (Юго-Запада Приморья, Лазовского заповедника, Уссурийского заповедника). Это может быть связано с меньшим антропогенным влиянием на животных в северных районах, плотность населения и количество дорог в которых значительно меньше, чем на юге Приморского края.

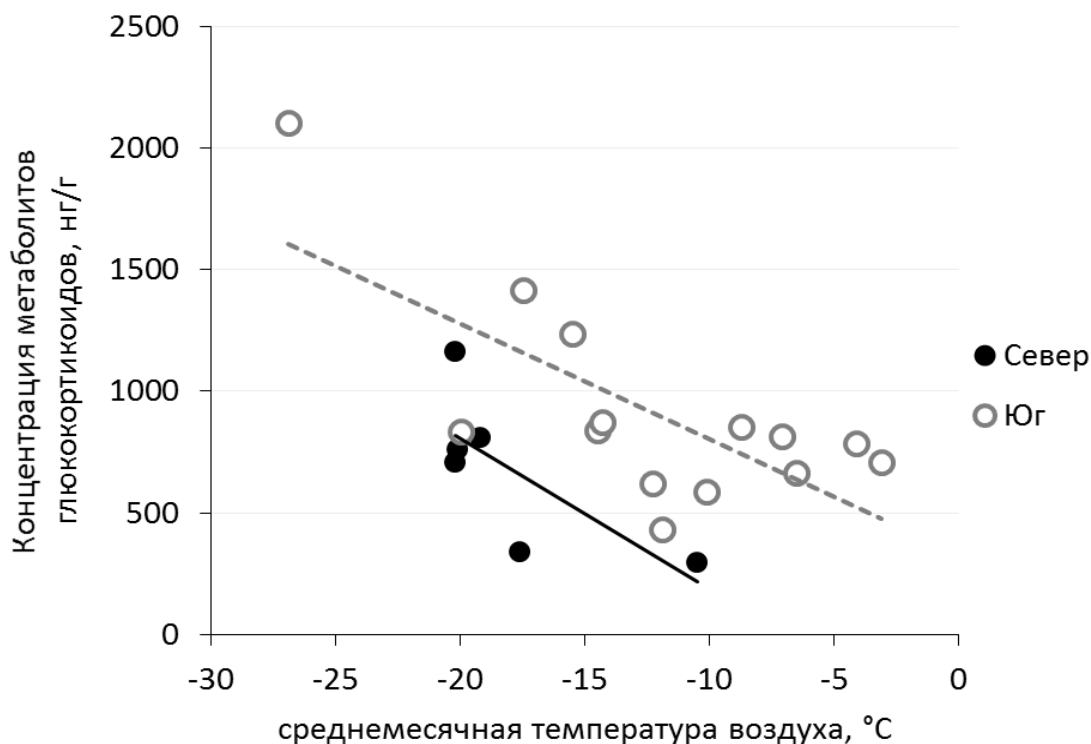


Рисунок 5. Концентрация метаболитов глюкокортикоидов у амурского тигра в разных частях ареала.

5.2. Влияние антропогенных и биотических факторов

Деятельность человека – один из главных факторов, воздействующих на природу в целом. Воздействие антропогенных факторов обычно приводит к повышению уровня глюкокортикоидов у животных (Creel et al., 2002; Wikelski et al., 2002; Martínez-Mota et al., 2007; Van Meter et al., 2009; Wasser et al., 2011; Creel et al., 2013). Деятельность человека оказывает сильное влияние на популяции крупных кошачьих на Дальнем Востоке. Например, наличие дорог и браконьерство негативно влияют на выживаемость самок и детёнышей амурского тигра (Kerley и др., 2002; Гудрич и др., 2005; Чэпрон и др., 2005).

В данной работе мы не выявили корреляции уровня глюкокортикоидов с какими-либо из рассмотренных нами антропогенных или биотических факторов для объединенной выборки из всех семи площадок. Одной из главных причин этого, вероятно, является сильное влияние, которое оказывает на уровень глюкокортикоидов температура воздуха, что требует для проведения анализа огромного массива данных.

Однако, наряду с температурой воздуха на концентрацию глюкокортикоидов у амурских тигров оказывал влияние и целый ряд других факторов. Так, на Юго-Западе Приморья среднемесячная температура воздуха в феврале 2010 года составляла $-14,1^{\circ}\text{C}$, а в феврале 2011 года – $-8,7^{\circ}\text{C}$. Это позволяло предположить, что уровень глюкокортикоидов у амурских тигров в 2010 году будет выше, чем в 2011 году. Однако, наши предположения не подтвердились. Концентрация метаболитов глюкокортикоидов в экскрементах тигров составляла $615 \pm 102,8$ нг/г в 2010 году и $949,6 \pm 232,8$ нг/г в 2011 году. Хотя различия были не достоверными (критерий Манна-Уитни: $Z=-1,19$; $n_1=15$; $n_2=10$; $p=0,23$), тенденция была обратна предположениям, сделанным на основе данных о влиянии температуры воздуха. Более того, у леопардов, обитающих на данной территории наблюдалась сходная картина – уровень глюкокортикоидов был ниже в менее морозный год. Причём эти различия ($361,4 \pm 80,5$ нг/г в феврале 2010 года и $712,7 \pm 92,4$ нг/г в феврале 2011 года) у леопардов были достоверны (критерий Манна-Уитни: $Z=2,09$; $n_1=11$; $n_2=28$; $p=0,04$) (рис. 6).

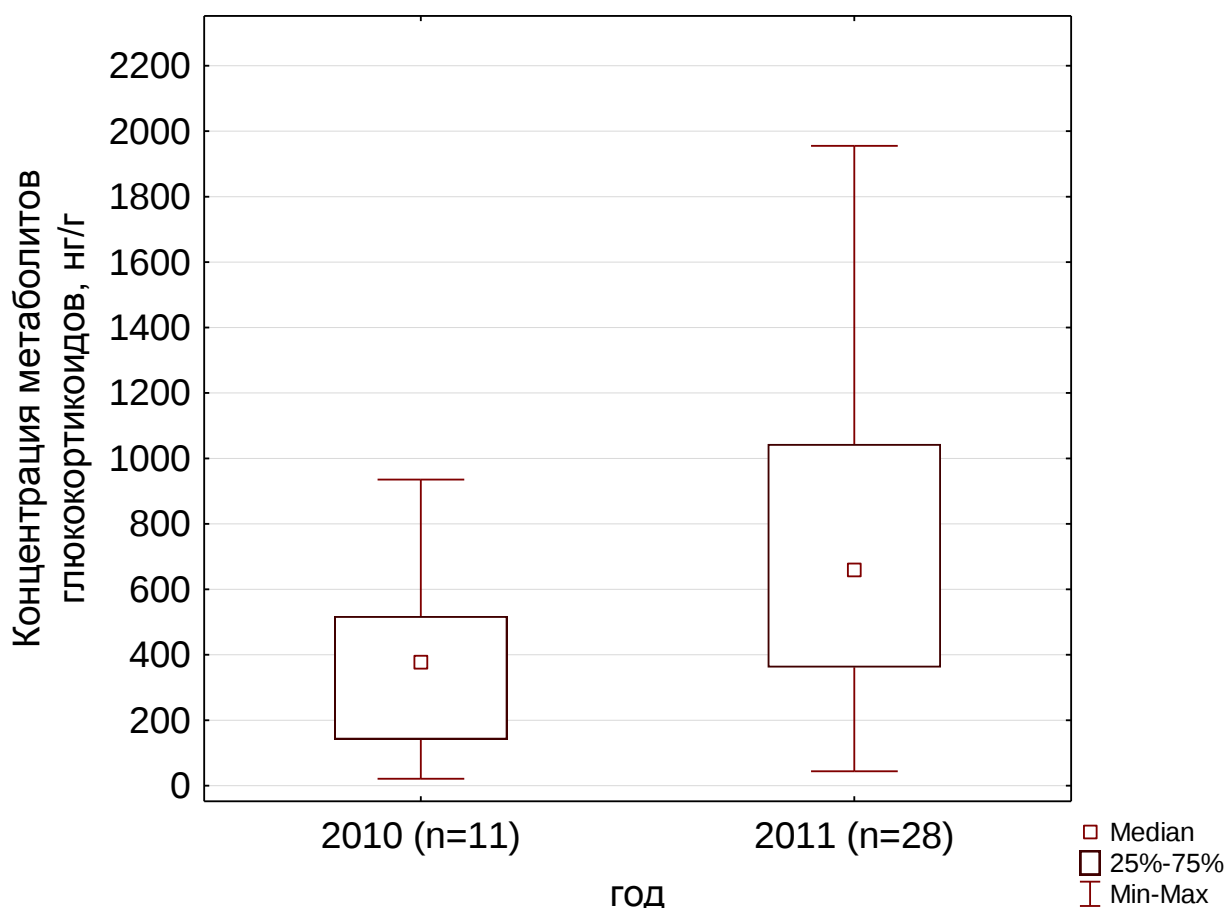


Рисунок 6. Уровень глюкокортикоидов у дальневосточных леопардов на Юго-Западе Приморья в феврале 2010 и 2011 годов.

Одно из возможных объяснений различий в концентрациях глюкокортикоидов дальневосточных леопардов в зимы 2009–2010 годов и 2010–2011 годов – крайне негативное влияние суровых погодных условий на копытных. Зима 2009–2010 годов была очень неблагоприятна для копытных (в первую очередь пятнистых оленей): животные не могли добывать корм и гибли от истощения (Маслов, Ковалёв, 2013; личн. набл.). Наличие ослабленных и погибших копытных могло значительно облегчать добывание корма для тигров и леопардов. Причём для леопардов, обычно предпочитающих более мелкую добычу, чем тигры (Karanth, Sunquist, 1995), пятнистый олень является основным объектом охоты в зимний период. У голодающих животных концентрация глюкозы в крови снижается. В ответ на это повышается уровень глюкокортикоидов, запускающих процесс глюконеогенеза (Schwartz et al., 1995; Barcellos et al., 2010). Соответственно, у животных, не испытывающих недостатка в корме, можно ожидать более низкий уровень глюкокортикоидов. Таким образом, хотя мы не обнаружили влияния плотности популяций видов жертв на благополучие амурского тигра,

мы можем говорить о том, что доступность пищи может оказывать значительное влияние на благополучие хищников.

Влияние температуры воздуха на уровень глюкокортикоидов у диких амурских тигров имеет большое значение для мониторинга благополучия популяций диких животных, особенно в зимний период. Оценка уровня глюкокортикоидов у животных в природе приобретает всё большую популярность, однако используется она главным образом для оценки отдельных биотических и антропогенных факторов. Наши результаты показывают, что для правильной интерпретации результатов, должны быть рассмотрены различные факторы, способные повлиять на уровень глюкокортикоидов. И в зимний период температура воздуха является одним из важнейших таких факторов.

Глава 6. Оценка репродуктивной активности самок в природе

Количество репродуктивно-активных самок в популяции является важным параметром для оценки её состояния. Уровень прогестерона повышается у самок млекопитающих, в том числе у амурского тигра и дальневосточного леопарда, при овуляции и остаётся крайне высоким в течение беременности. При этом для кошачьих характерна так называемая ложная беременность, когда после спаривания уровень прогестерона изменяется так же, как при обычной беременности, и достигает тех же значений, оставаясь высоким на протяжении примерно половины продолжительности настоящей беременности (Brown, 2011; Kinoshita et al., 2011). В то же время для подавляющего большинства кошачьих характерен индуцированный тип овуляции (Moreira et al., 2001), то есть овуляция происходит только после спаривания с самцом. Это позволяет использовать уровень прогестерона у самок как косвенный показатель наличия в популяции репродуктивно активных самцов, что может играть большую роль для малочисленных популяций редких видов.

В неволе во время беременности уровень прогестерона у самок амурского тигра и дальневосточного леопарда был в 14 раз выше, чем в период покоя репродуктивной системы. В качестве достоверной границы базального уровня прогестерона обычно используется значение $M+2SD$. Для амурского тигра оно составило 7227,8 нг/г, для дальневосточного леопарда – 9358,5 нг/г. По образцам, собранным на Дальнем Востоке в феврале и марте 2010 года, были индивидуально идентифицированы 11 самок амурского

тигра. Концентрации метаболитов прогестерона в этих образцах составляли от 428 до 76606,2 нг/г. У 3 самок тигра концентрация метаболитов прогестерона в экскрементах составила более 10000 нг/г, что говорит об активации половой системы у этих животных. По образцам, собранным на Юго-Западе Приморья в феврале 2011 года, были идентифицированы 3 самки дальневосточного леопарда. Концентрация метаболитов прогестерона в этих образцах составляла 3521,1; 3900,0 и 1954,1 нг/г. Таким образом, среди трех указанных особей дальневосточного леопарда, самок в лютеальной фазе выявлено не было.

Заключение

Неинвазивное определение уровня глюкокортикоидов у животных в природе приобретает всё большее значение, однако используется оно главным образом для оценки влияния отдельных биотических и антропогенных факторов. Наши результаты показывают, что для правильной интерпретации результатов должны быть рассмотрены различные факторы, способные повлиять на уровень глюкокортикоидов. Для мониторинга благополучия популяции диких амурских тигров крайне важное значение имеет выявленное нами сильное влияние температуры воздуха на уровень глюкокортикоидов у диких животных в зимний период. При учёте влияния температуры появляется возможность оценить воздействие на животных антропогенного пресса, доступности пищи и других факторов, определяющих благополучие их популяций. Использование данной методики представляется необходимым для оценки благополучия и доли репродуктивно активных самок в популяциях редких видов и может быть рекомендовано для ежегодного мониторинга состояния популяций амурского тигра и дальневосточного леопарда.

Выводы

- 1 Валидирована неинвазивная методика оценки гормонального статуса у амурского тигра, дальневосточного леопарда и манула.
- 2 Показано наличие сезонных изменений в уровне глюкокортикоидов у амурского тигра и дальневосточного леопарда. У манула такие изменения не выявлены. Характер сезонных изменений является видоспецифичным и может быть использован для оценки состояния животных этих видов в природе.
- 3 Сравнение уровня глюкокортикоидов у животных исследованных видов показано, что содержание в неволе неоднозначно влияет на их уровень, что связано с комплексным воздействием факторов как в неволе, так и в природе.
- 4 Показано, что различия в условиях содержания в неволе оказывают значительное влияние на уровень глюкокортикоидов у амурских тигров и дальневосточных леопардов. Важное значение имеет фактор беспокойства (экспозиция посетителям).
- 5 У амурского тигра не выявлено связи уровня глюкокортикоидов с обилием жертв, плотностью популяции хищника и глубиной снежного покрова.
- 6 Прослеживается влияние антропогенной нагрузки и доступности пищи на уровень глюкокортикоидов у амурского тигра.
- 7 Наибольшее влияние на уровень глюкокортикоидов у амурских тигров оказывает температура воздуха, которую следует учитывать при оценке действия других факторов.
- 8 Уровень прогестерона может быть использован в качестве показателя репродуктивной активности животных в популяциях амурского тигра и дальневосточного леопарда в природе.

Благодарности

Автор глубоко и искренне благодарен к.б.н С.В. Найдено за научное руководство и неоценимую помощь при выполнении работы. Автор благодарит А.Л. Антоневиц за поддержку на всём протяжении работы, за обсуждение результатов работы и помощь в работе над текстом. Автор глубоко признателен М.В. Холодовой и В.В. Рожнову за огромную помощь в работе над текстом диссертации и автореферата. Автор выражает благодарность Е.В. Павловой за помощь в освоении методов работы и сборе

материала; М.Н. Ерофеевой, Г.С. Алексеевой и всему коллективу НЭБ «Черноголовка» ИПЭЭ РАН за рабочую атмосферу и обсуждение работы. Автор благодарен П.А. Сорокину за генетическую идентификацию образцов из природы; коллективам Уссурийского заповедника, Специнспекции «Тигр» и всем людям, учувствовавшим в ежегодных учётах тигра за сбор образцов в природе; коллективам зоопитомника Московского зоопарка и Новосибирского зоопарка за предоставление образцов от содержащихся у них животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Русского географического общества, в рамках проектов: «Изучение амурского тигра на Российском Дальнем Востоке» и «Изучение, сохранение и восстановление дальневосточного леопарда на Российском Дальнем Востоке», а также в рамках программ фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Список опубликованных работ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК

1. Найдено С.В., Иванов Е.А., Лукаревский В.С., Эрнандес Бланко Х.А., Сорокин П.А., Литвинов М.Н., Котляр А.К., Рожнов В.В., 2011. Активность системы гипоталамус-гипофиз-надпочечники у амурских тигров (*Panthera tigris altaica*) в неволе и в природе и ее изменение в течение года. // Известия РАН. Сер. биологич. №3. С. 358–363.

Материалы и тезисы конференций

2. Найдено С.В., Иванов Е.А., Лукаревский В.С., Эрнандес-Бланко Х.А., Сорокин П.А., Литвинов М.Н., Котляр А.К., Рожнов В.В. 2010. Использование неинвазивных подходов к оценке гормонального статуса Амурских тигров (*Panthera tigris altaica*). // «Амурский тигр в Северо-Восточной Азии: проблемы сохранения в XXI веке». Отв. Ред. Журавлев Ю.Н. Владивосток: Дальнаука. С. 124–128.
3. Naidenko S.V., Ivanov E.A., Lukarevskii V.S., Hernandez-Blanco J.A., Sorokin P.A., Kotlyar A.K., Litvinov M.N., Rozhnov V.V., 2010. Factors affecting tiger adrenal activity in the wild. // Proceedings of the First annual meeting of ISWE. P. 22.

4. Иванов Е.А., Найдено С.В., 2010. Использование неинвазивных методов для мониторинга гормонального статуса крупных кошачьих. // Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова “Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых”. Москва: КМК. С. 141–144.
5. Иванов Е.А., 2011. Неинвазивный мониторинг гормонального статуса амурского тигра в неволе и природе. // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2011» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, М.В. Чистякова. Москва: МАКС Пресс. С. 299.
6. Иванов Е.А., Найдено С.В., Рожнов В.В., 2011. Неинвазивный мониторинг гормонального статуса амурского тигра. // Териофауна России и сопредельных территорий. Материалы международного совещания, 1–4 февр. Москва: КМК. С. 185.
7. Иванов Е.А., 2012. Валидация и использование неинвазивной методики оценки уровня кортизола у дальневосточного леопарда (*Panthera pardus orientalis*). // Материалы конференции молодых сотрудников и аспирантов института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова “Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых”. Москва: КМК. С. 21.

Подписано в печать: 15.11.2013

Тираж: 100 экз. Заказ № 1037

Отпечатано в типографии «Реглет»

г. Москва, Ленинградский проспект, д. 74

(495)790-47-77 www.reglet.ru