

**ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА САМОК АМУРСКОГО ТИГРА
(*PANTHERA TIGRIS ALTAICA*; FELIDAE, MAMMALIA)
В ПРИРОДЕ НЕИНВАЗИВНЫМИ МЕТОДАМИ**

**Е. А. Иванов, П. А. Сорокин, Х. А. Эрнандес-Бланко,
В. С. Лукаревский, В. В. Рожнов, С. В. Найдено**

*Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 33
E-mail: evgivanov@ya.ru*

Поступила в редакцию 23.06.14 г.

Оценка репродуктивного статуса самок амурского тигра (*Panthera tigris altaica*; Felidae, Mammalia) в природе неинвазивными методами. – Иванов Е. А., Сорокин П. А., Эрнандес-Бланко Х. А., Лукаревский В. С., Рожнов В. В., Найдено С. В. – Феномен ложной беременности затрудняет определение беременности на основании уровня прогестерона у самок кошачьих, особенно в природе. Тем не менее, уровень прогестерона можно использовать для изучения репродуктивной активности диких кошачьих. Благодаря тому, что для большинства кошачьих характерен индуцированный тип овуляции и длительный период ложной беременности, высокий уровень прогестерона можно использовать как показатель того, что самка недавно спаривалась. Использование неинвазивных методов оценки гормонального статуса и неинвазивной индивидуальной идентификации животных позволит изучать репродуктивную активность, оценивая количество спаривавшихся самок в популяции. В рамках данной работы мы валидировали использование набора для ИФА («Имунофа-ПГ», Иммунотех, Россия) для неинвазивной оценки уровня прогестерона, сравнив иммунореактивность в экстрактах из экскрементов одной самки амурского тигра, собранных во время беременности и после родов. Также образцы экскрементов амурского тигра были собраны на Дальнем Востоке в феврале 2011 г. Для каждого из образцов ($n = 28$) был определён пол животного и произведена индивидуальная идентификация особи, оставившей образец. В экскрементах самок оценивалась концентрация метаболитов прогестерона. У 3 из 11 самок уровень прогестерона был повышен, что свидетельствует о том, что они спаривались в течение месяца, предшествовавшего сбору образцов.

Ключевые слова: амурский тигр, репродуктивная активность, ложная беременность.

Noninvasive assessment of the female reproductive status in the wild Amur tiger (*Panthera tigris altaica*; Felidae, Mammalia). – Ivanov E. A., Sorokin P. A., Hernandez-Blanco J. A., Lukarevskii V. S., Rozhnov V. V., and Naidenko S. V. – Pseudopregnancy complicates pregnancy diagnostics depended on progesterone levels in female felids, especially in the wild. However, progesterone level still can be a useful tool to assess reproductive activity in wild felids populations. Due to long-term pseudopregnancy and induced ovulation, which are predominant in Felidae, high progesterone levels can be used to distinguish copulated females. Noninvasive hormonal assessment coupled with noninvasive genetical identification allows us exploring reproduction activity by assessing copulated females numbers with a high accuracy. We validated a progesterone EIA kit («Immunofa-PG», Immunotech, Russian Federation) for noninvasive hormonal analysis by comparing immunoreactivity associated with antibodies in feces of one female of Amur tiger collected during pregnancy and after accouchement. We also run a preliminary study in the wild. Amur tiger feces were collected in the Russian Far East in February, 2011. For each sample ($n = 28$) the sex and individuality were identified. Samples from females were assessed for fecal progesteragens. Our analysis revealed 3 (of 11) females having high progesterone and thus copulated within one month before our sample collection.

Key words: Amur tiger, reproduction activity, pseudopregnancy.

Амурский тигр (*Panthera tigris altaica* Temminck, 1844) – самый северный подвид тигра. В отличие от других подвидов, он обитает в условиях сильного годового перепада температур, с глубоким снежным покровом в зимний период. Несмотря на относительно стабильную численность в последние годы, амурский тигр испытывает сильную антропогенную нагрузку и продолжает оставаться уязвимым видом. Для успешного сохранения амурского тигра необходимы методы, позволяющие достоверно оценивать состояние природной популяции. Одним из важнейших параметров может стать оценка репродуктивной активности животных.

Для самок большинства млекопитающих оценка уровня прогестерона в плазме либо в сыворотке крови или его метаболитов в экскретах (моче, экскрементах) может предоставлять достоверную информацию о беременности. Для кошачьих определение беременности сильно затруднено из-за феномена ложной беременности, когда после спаривания уровень прогестерона также достигает высоких значений и остаётся высоким на протяжении длительного времени, обычно от трети до половины продолжительности настоящей беременности (Seal et al., 1985; Brown, 2011; Kinoshita et al., 2011) за счет высокой гормональной активности желтых тел после овуляции. Для большинства представителей семейства характерен индуцированный тип овуляции, при котором овуляция и соответственно резкое и значительное повышение уровня прогестерона происходит только после спаривания (Moreira et al., 2001; Brown, 2011). Несмотря на сложность распознавания истинной беременности у кошачьих, повышенный уровень прогестерона у самок позволяет констатировать факт спаривания и косвенно оценить наличие в популяции репродуктивно активных самцов, что может играть большую роль для малочисленных популяций редких видов. Поскольку уровень прогестерона остаётся повышенным значительное время (для *P. tigris* – 108 (в течение истинной беременности) либо 35 дней после спаривания (ложная беременность) (Brown, 2011)), даже единичная оценка уровня прогестерона может быть информативной. При работе в природе наиболее целесообразными представляются методы неинвазивной оценки гормонального статуса по концентрации гормонов и их метаболитов в экскрементах животных (Герлинская и др., 1993; Sheriff et al., 2011).

Неинвазивная оценка уровня прогестерона в сочетании с методами неинвазивной молекулярно-генетической индивидуальной идентификации животных позволяют собирать достаточное количество данных для того, чтобы судить о репродуктивном состоянии группировок кошачьих в природе без отлова животных.

Целью настоящего исследования было оценить возможность применения методики неинвазивной оценки уровня прогестерона у самок амурского тигра для использования её в природе.

Образцы экскрементов амурского тигра ($n = 28$) в природе были собраны в феврале 2011 г. в ходе ежегодных полевых работ по изучению амурского тигра на Дальнем Востоке (Miquelle et al., 2011) на 5 учётных площадках на территории Приморского и Хабаровского краёв. Тропления проводили на 5 – 10-й день после снегопада. Все образцы экскрементов при сборе разделяли на две части: для молекулярно-генетической идентификации и оценки уровня гормонов. Затем образцы замораживали и в замороженном виде доставляли в Институт проблем экологии и

ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА САМОК АМУРСКОГО ТИГРА

эволюции им. А. Н. Северцова РАН, где хранили при температуре -18°C до проведения анализа.

Выделение ДНК из экскрементов проводили с использованием набора QIAamp DNA Stool Mini Kit («Qiagen», США). Для индивидуальной идентификации и определения пола использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с 9 микросателлитными и 1 половым праймерами. Длины 9 микросателлитных и 1 полового фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 с добавлением стандарта Liz 500 и программы GeneMapper v 4.0 («Applied Biosystems», США). Для уменьшения вероятности ошибки получаемых данных ПЦР с образцами ДНК из экскрементов проводили минимум 4 раза (Рожнов и др., 2009).

Экстракцию образцов для оценки уровня гормонов проводили встряхиванием навески образца в 90%-ном метаноле в течение 30 мин. с последующим центрифугированием (Павлова, Найденко, 2008; Jewgenow et al., 2006). Кроме того, рассчитывали влажность каждого образца и пересчитывали концентрацию метаболитов прогестерона на 1 г сухих экскрементов. Концентрацию метаболитов прогестерона в экскрементах измеряли методом гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием наборов «Иммунофа-ПГ» (Иммунотех, Россия).

Для биологической валидации методики неинвазивной оценки уровня прогестерона у амурского тигра сравнивали концентрацию веществ иммунореактивных к используемым антителам в экскрементах, собранных у одной самки амурского тигра из Новосибирского зоопарка в период беременности и в период покоя репродуктивной системы.

Концентрация метаболитов прогестерона в экскрементах самки амурского тигра в Новосибирском зоопарке в период беременности составляла 34.3 ± 2.9 мкг/г; в период покоя репродуктивной системы – 2.5 ± 0.5 мкг/г (рис. 1). Значения для разных периодов достоверно различались (критерий Манна – Уитни: $Z = 5.28$; $n_1 = 16$; $n_2 = 33$; $p = 0.000$). Это позволяет говорить о том, что использованная нами методика позволяет определять произошедшую у самки овуляцию.

Тест на параллелизм не выявил достоверных различий в угле наклона кривых связывания кортизола в серии разведений стандартного раствора гормона и экстракта из экскрементов, что говорит о том, что применяемые антитела обладают специфичностью, позволяющей определять уровень метаболитов прогестерона/нативного гормона в экскрементах животного (рис. 2).

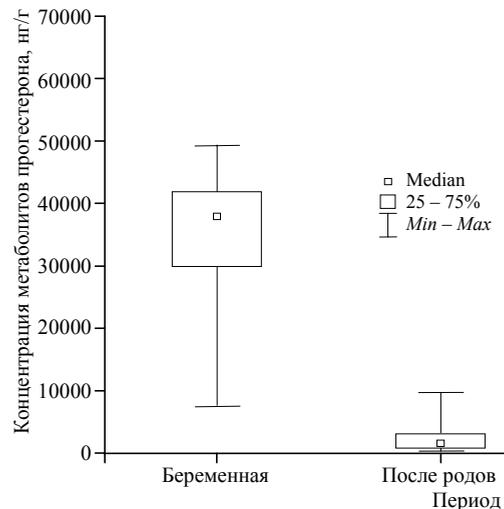


Рис. 1. Концентрация метаболитов прогестерона у самки амурского тигра в период беременности и в период покоя репродуктивной системы

В качестве верхней границы базального уровня прогестерона мы использовали значение $M+2SD$, оно составило 7.2 мкг/г.

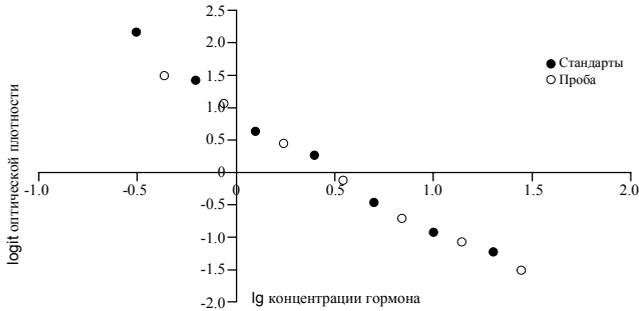


Рис. 2. Кривые связывания гормона в стандартных растворах и разведенной пробе. $\text{LogitOP} = \ln P - \ln(1 - P)$, где P – отношение оптической плотности пробы / стандарта к оптической плотности нулевого стандарта

По собранным в природе образцам ($n = 28$) были идентифицированы 11 самок амурского тигра. Повышенный уровень прогестерона был зафиксирован у трёх из них (17.2, 76.6 и 16.1 мкг/г соответственно) (рис. 3). Таким образом, в природе удалось выделить недавно спаривавшихся самок, доля которых составила 27%. По данным, полученным Л. Кёрли с соавторами (Kerley et al., 2003) в Сихотэ-Алинском заповеднике, амурские тигры могут спариваться на протяжении всего года, однако чаще всего спаривания происходят с марта по май. Эти данные согласуются с небольшим количеством спаривавшихся самок в нашей выборке, где образцы были собраны в зимний период. В то же время все три самки, у которых был обнаружен повышенный уровень прогестерона, обитают на юге Хабаровского края – значительно севернее Сихотэ-Алинского заповедника. Однако для того чтобы говорить о возможном влиянии климатических условий на репродуктивную активность у амурского тигра, необходимы дальнейшие исследования.

Количество репродуктивно-активных самок в популяции является важным параметром для оценки её состояния. Неблагоприятные условия могут вести к снижению репродуктивной активности животных, в некоторых случаях они могут перестать размножаться (Wingfield, Sapolsky, 2003). Регулярный мониторинг уровня прогестерона у самок тигров в природных популяциях позволит проследить изменения в репродуктивной активности самок тигра в природе.

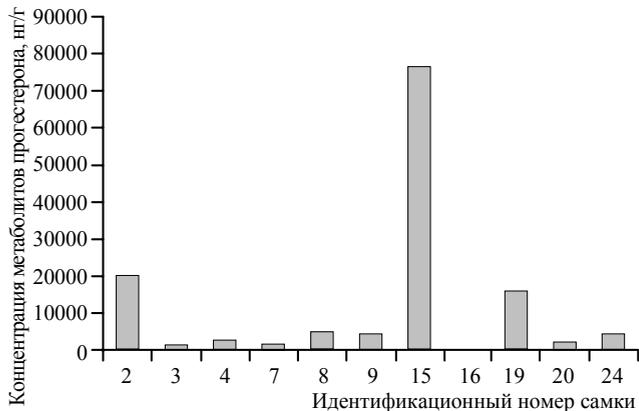


Рис. 3. Концентрация метаболитов прогестерона у самок амурского тигра в природе в феврале и марте 2011 г.

Использование данной методики представляется перспективным

По данным, полученным Л. Кёрли с соавторами (Kerley et al., 2003) в Сихотэ-Алинском заповеднике, амурские тигры могут спариваться на протяжении всего года, однако чаще всего спаривания происходят с марта по май. Эти данные согласуются с небольшим количеством спаривавшихся самок в нашей выборке, где образцы были собраны в зимний период. В то же время все три самки, у которых был обнаружен повышенный уровень прогестерона, обитают на юге Хабаровского края – значительно севернее Сихотэ-Алинского заповедника. Однако для того чтобы говорить о возможном влиянии климатических условий на репродуктивную активность у амурского тигра, необходимы дальнейшие исследования.

Использование данной методики представляется перспективным

ОЦЕНКА РЕПРОДУКТИВНОГО СТАТУСА САМОК АМУРСКОГО ТИГРА

для оценки доли репродуктивно активных самок в популяциях амурского тигра при ежегодном мониторинге состояния его популяции, осуществляемом на Дальнем Востоке России уже более 15 лет.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 14-04-32022) и Русского географического общества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Герлинская Л. А., Мошкин М. П., Евсиков В. И. Методические подходы к оценке стрессированности диких млекопитающих // Экология. 1993. № 6. С. 97 – 100.

Павлова Е. В., Найдено С. В. Неинвазивный мониторинг глюкокортикоидов в экскрементах дальневосточного лесного кота (*Prionailurus bengalensis euptilura*) // Зоол. журн. 2008. Т. 87, № 11. С. 1375 – 1381.

Рожнов В. В., Сорокин П. А., Найдено С. В., Лукаревский В. С., Эрнандес Бланко Х. А., Литвинов М. Н., Котляр А. К., Юдин В. Г. Неинвазивная индивидуальная идентификация амурских тигров (*Panthera tigris altaica*) молекулярно-генетическими методами // Докл. РАН. 2009. Т. 429, № 2. С. 278 – 282.

Brown J. L. Female reproductive cycles of wild female felids // Animal Reproduction Science. 2011. Vol. 124, № 3 – 4. P. 155 – 162.

Jewgenow K., Naidenko S. V., Goeritz F., Vargas A., Dehnhard M. Monitoring testicular activity of male Eurasian (*Lynx lynx*) and Iberian (*Lynx pardinus*) lynx by fecal testosterone metabolite measurement // General and Comparative Endocrinology. 2006. Vol. 149, № 2. P. 151 – 158.

Kerley L. L., Goodrich J. M., Miquelle D. G., Smirnov E. N., Quigley H. B., Hornocker M. G. Reproductive Parameters of Wild Female Amur (Siberian) Tigers (*Panthera tigris altaica*) // J. Mammal. 2003. Vol. 84, № 1. P. 288 – 298.

Kinoshita K., Inada S., Seki K., Sasaki A., Hama N., Kusunoki H. Long-term monitoring of fecal steroid hormones in female snow leopards (*Panthera uncia*) during pregnancy or pseudopregnancy // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, № 5. P. e19314.

Miquelle D. G., Dunishenko Y. M. A., Zvyagintsev D. A., Darensky A. A., Golyb A. M., Dolinin V. V., Shvets V. G., Kostomarov S. V., Aramilev V. V., Fomenko P. V., Litvinov M. N., Nikolaev I. G., Pikunov D. G., Salkina G. P., Zaumyslova O. Y., Kozhichev R. P., Nikolaeva E. I. A monitoring program for the Amur tiger : thirteenth-year report : 1998 – 2010 / Wildlife Conservation Society. Vladivostok, 2011. 25 p.

Moreira N., Monteiro-Filho E. L., Moraes W., Swanson W. F., Graham L. H., Pasquali O. L., Gomes M. L., Moraes R. N., Wildt D. E., Brown J. L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus // Zoo Biol. 2001. Vol. 20, № 2. P. 103 – 116.

Seal U. S., Plotka E. D., Smith J. D., Wright F. H., Reindl N. J., Taylor R. S., Seal M. F. Immunoreactive luteinizing hormone, estradiol, progesterone, testosterone, and androstenedione levels during the breeding season and anestrus in Siberian tigers // Biology of Reproduction. 1985. Vol. 32, № 2. P. 361 – 368.

Sheriff M. J., Dantzer B., Delehanty B., Palme R., Boonstra R. Measuring stress in wildlife : techniques for quantifying glucocorticoids // Oecologia. 2011. Vol. 166, № 4. P. 869 – 887.

Wingfield J. C., Sapolsky R. M. Reproduction and resistance to stress : when and how // J. of Neuroendocrinology. 2003. Vol. 15, № 8. P. 711 – 724.