

УДК 591.37-599.322.2:591.551

УСПЕХ РАЗМНОЖЕНИЯ И НАПРАВЛЕНИЕ СКРЕЩИВАНИЯ ОСОБЕЙ В ГИБРИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ БОЛЬШОГО (*Spermophilus major*) И ЖЕЛТОГО (*Spermophilus fulvus*) СУСЛИКОВ

© 2011 г. А. А. Шмыров*, Ан. А. Кузьмин**, Ал. А. Кузьмин***, С. В. Титов***

* Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва, Ленинский просп., 33

** Пензенская государственная технологическая академия, 440605 Пенза, пр. Байдукова/Гагарина, 1а/11

*** Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского,
440026 Пенза, ул. Лермонтова, 37

e-mail: shm-andrey2005@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.12.2010 г.

В гибридном поселении большого и желтого сусликов репродуктивные отношения особей являются панмиксичными, характеризующиеся отсутствием ассортативности скрещиваний, наличием у самок многосамцовых спариваний с выраженной гетероспермностью выводков. Максимальный репродуктивный успех отмечен для гибридных особей, доказывающий фертильность гибридов. Однако репродуктивный потенциал гибридов по выживаемости детенышей достоверно ниже, по сравнению с большими и желтыми сусликами, но выживаемость гибридного потомства в гибридной популяции не ниже, чем в видовых поселениях.

Проблема установления родственных связей и отцовства — одна из ключевых тем современной поведенческой экологии, которая тесно связана с проблемой конфликта полов и общей теорией эволюции социальных систем (Krebs, Davies, 1993). Как показывают результаты современных генетических исследований (Hunter *et al.*, 1992), описание и анализ социальных отношений невозможно без анализа генетической стороны социальных связей, так как она часто не соответствует наблюдаемым в природе отношениям между половыми партнерами и между родителями и потомством. Актуальность и еще более уникальность этого направления исследований значительно возрастает в исследованиях гибридных популяций, поскольку изучение отношений родственных линий контактирующих видов в гибридном поселении позволит выявить одномоментные акты скрещивания видов и достоверно установить направление и частоту возвратных скрещиваний гибридов. Исследования возникающей новой группировки гибридных зверьков, родственной особям родительских видов, позволят установить степень влияния индивидуальных генетических особенностей особей на складывающуюся между ними социальную систему. Кроме того, установление генетического отцовства и материнства важно для оценки генетических последствий множественного или исключительного отцовства, а также для выявления механизмов поддержания генетического разнообразия на популяционном и даже надвидовом уровне и генетических особенностей взаимоотношения полов (Титов и др., 2005). Для уста-

новления отцовства, родственных связей и репродуктивного успеха у разных видов наземных беличьих (*Spermophilus richardsonii*, *Cynomys gunnisoni*, *C. parvidens*, *C. ludovicianus*, *Marmota caligata*, *M. marmota*) успешно используется микросателлитный анализ (Goossens *et al.*, 1998; Haynie *et al.*, 2003).

Количественная оценка репродуктивного успеха позволяет оценить совокупную приспособленность особи, успешность передачи генов в череде поколений, сопоставить эффективность различных поведенческих и репродуктивных стратегий, установить прямые и косвенные эффекты на динамику численности, динамику генетической структуры популяции, устойчивость популяций и генетическое разнообразие (Krebs, Davies, 1993; Goossens *et al.*, 1998, 2001). Исследования подобного рода на практике редки, поскольку требуют одновременных наблюдений за мечеными популяциями, позволяющими проследить жизненные циклы отдельных особей и поколений. Наземные беличьи, как зимоспящие и размножающиеся раз в году животные, в силу специфичности своего годового и жизненного цикла являются удобной и традиционной моделью для таких исследований. Однако подавляющее большинство таких работ посвящено изучению небольшого числа и только северо-американских видов сусликов (Sherman, Morton, 1979; Foltz, Schwagmeyer, 1989; Beallsforff *et al.*, 1994; Haynie *et al.*, 2003 и др.), тогда как евразийские виды в этом отношении мало изучены.

Цель исследования — количественная оценка репродуктивного успеха и анализ направления

скрещивания родительских видов и гибридов, а также установление структуры родственных связей в гибридном поселении большого и желтого сусликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основу работы положены результаты многолетних наблюдений (2004–2008 гг.) за мечеными сусликами в их естественной среде в гибридном поселении большого и желтого сусликов (с. Уса-тово, Краснокутский р-н, Саратовская обл.).

Сусликов отлавливали донскими ловушками на стационарных площадках на протяжении сезона их активности, ранней весной (апрель), сразу после их выхода из спячки, а также в период появления на поверхности выводков (июнь). За период исследования было отловлено и помечено 168 особей: *Spermophilus major* – 27 экз., *Spermophilus fulvus* – 7 экз. и межвидовых гибридов – 134 экз.

Проводили прижизненное (без вмешательства в естественные процессы взаимодействия видов и формирования гибридного поселения, т.е. без изъятия из популяции) индивидуальное мечение всех зверьков. Это позволило проследить многолетнюю динамику состава и пространственного распределения населения, контакты особей, оценить их выживаемость, репродуктивный успех. Индивидуальные метки наносили по стандартной схеме ампутацией пальцев (Карасева, Телицына, 1996). Образцы тканей фиксировали в 96%-ном этаноле, в дальнейшем они были использованы в молекулярно-генетическом анализе. Выделение ДНК проводили стандартным методом фенол-хлороформной экстракции (Arrigi *et al.*, 1968). Для определения видовой принадлежности отловленных особей и выявления гибридов в анализе были использованы пять молекулярно-генетических маркеров, специфических для сусликов Евразии: контрольный регион мтДНК (С-регион, D-loop), наследующийся только по материнской линии; четыре маркера ядерной ДНК – интрон шестого протоонкогена *p53*, ответственного за апоптоз, псевдоген (Ψ) гена *p53*, интрон пятого гена *ZfX* (*zinc-finger gene*), локализованного на X-хромосоме, интрон восьмого гена *SmcY* (*male-specific histocompatibility antigen*), локализованного на Y-хромосоме и позволяющего отслеживать отцовские линии.

Для амплификации и рестрикции указанных выше маркеров были использованы специфические для сусликов праймеры, разработанные для исследования гибридизации сусликов в Поволжье (Ермаков и др., 2002; 2006).

Кроме этого, в качестве метода оценки репродуктивного успеха, а также определения родства и отцовства проводился анализ микросателлитной ДНК, который проводили в два этапа: амплифицирование со специфическими праймерными си-

стемами и электрофоретическое разделение полученных фрагментов ДНК, содержащих микросателлитные повторы.

Основу микросателлитного анализа составляет анализ микросателлитных последовательностей, которые отличаются друг от друга массами с шагом, соответствующим одному или нескольким микросателлитным повторам. При этом в работе отдавалось предпочтение мультилокусным сателлитным последовательностям, так как широкий аллельный спектр позволяет значительно повысить точность определения отцовства и степени родства. Для еще большего повышения чувствительности используемых нами аналитических процедур мы использовали принцип множественной проверки, т.е. признание родства и отцовства осуществлялось только после проведения анализа по нескольким системам праймеров.

В работе с микросателлитными повторами были использованы три разработанные нами специфические для евразийских видов сусликов праймерные системы (Титов и др., 2007), тестирующие тетра- и триплетные микросателлитные повторы: IGS-bm (ACC-повтор), D – 5'-AAGCAGAGAAGTGGTAC-TAC-3', R – 5'-AACATTGTTTCCCTTGCTATC-3' ($T_{отж} = 58^{\circ}\text{C}$); IGS-bp (CAG-повтор), D – 5'-CTACCAGGAAAGAАCTCC-3', R – 5'-CTCCTACAC-CCCTTCTGAC-3' ($T_{отж} = 60^{\circ}\text{C}$); STR1 (GGAA-повтор), D – 5'-GGAGGAGGCTCATGAGACAG-3', R – 5'-CTAAAATAAAGTCTATTAAGGCTT-3' ($T_{отж} = 62^{\circ}\text{C}$).

Для оценки репродуктивного успеха, анализа направления скрещивания родительских видов и гибридов и установления структуры родственных связей в контактном поселении использовали следующие процедуры:

- весной в период гона в ходе визуальных наблюдений регистрировали половые контакты самцов и самок, устанавливая индивидуальную и видовую принадлежность потенциальных половых партнеров;

- успех размножения оценивали по числу произведенных самцом или самкой и генетически установленных прямых потомков, а также по числу прямых потомков, доживших до вступления в размножение. Такие оценки, наиболее адекватно отражающие репродуктивный успех особи, получены для каждого самца и самки с известной историей жизни за каждый год и за весь жизненный цикл. Отцовство и происхождение детенышей устанавливали на основании молекулярно-генетического анализа образцов, собранных от индивидуально меченых особей на протяжении всех лет наблюдений за поселением сусликов (от предполагаемых отцов, матерей и их потомства);

- ассортативность спариваний проверяли, сравнивая наблюдаемое распределение скрещиваний особей с ожидаемым, исходя из соотноше-

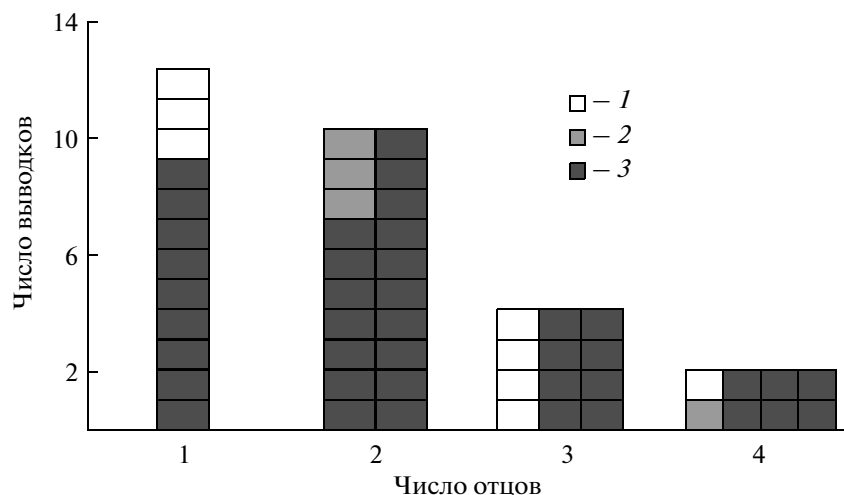


Рис. 1. Распределение выводков по гетероспецифичным самцам.
1 – *S. major*, 2 – *S. fulvus*, 3 – гибриды.

ния родительских видов и гибридов в составе населения.

Обработку материала проводили в пакете программ Statistica for Windows (StatSoft.® Inc. 1984–2001) с помощью непараметрических критериев сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ социальных отношений невозможен без анализа генетической основы социальных связей, поскольку “видимая” наблюдателю природа отношений – между родителями и “потомством”, между половыми партнерами – часто не соответствует действительности, как показывают результаты некоторых генетических исследований (Hunter *et al.*, 1992). Например, как показывает молекулярно-генетический анализ потомства у калифорнийских сусликов (*Spermophilus beecheyi*) множественные спаривания самок с самцами закономерно приводят к множественному отцовству (Boellstorff *et al.*, 1994). Однако у арктических сусликов (*Spermophilus parryii*) и колумбийских сусликов (*Spermophilus columbianus*) множественные спаривания не приводят к множественному оплодотворению (Lacey *et al.*, 1997).

Полученные нами предварительные данные, свидетельствующие о низкой частоте множественного отцовства у желтого суслика и отсутствия такого у большого суслика, подтверждают, что контакты самок с несколькими самцами не является достаточным условием для множественного оплодотворения у евразийских видов наземных беличьих.

Однако, как показывают наши наблюдения, в гибридном поселении большого и желтого сусли-

ков большая часть размножающихся самок участвовала в многосамцовых спариваниях (56%, $n = 16$). В 67% таких случаев самцов было два, в 22% случаев три самца и в одном случае (11%) – четыре.

Основная часть выводков ($n = 18$, 64%) получена в результате скрещивания гибридный самец × гибридная самка (51%), 18% выводков приходится на пару спаривания самец *S. Major* × гибридная самка, 14% получено от пары гибридный самец × самка *S. major* и 4% от пары самец *S. Fulvus* × гибридная самка (рис. 1). Доля особей гибридного происхождения среди прибылого поколения составила 82%, а доля больших сусликов – всего 18%. Из них выжили 41% зверьков, которые являлись гибридами. Из детенышей *S. major* в составе поселения были отмечены только 5%.

Кроме того, нами были зафиксированы два случая (в 2004 г. и 2008 г.) успешных спариваний одного самца с двумя самками.

При такой особенности половых контактов следует ожидать множественного отцовства в выводках. Действительно, доля гетероспермных выводков оказалась достаточно высокой (в 7 из 16 выводков, 44%) и в среднем за четыре года наблюдений (2004 г., 2006–2008 гг.) составила $37.3 \pm 9.8\%$.

Ранее гетероспермные пометы отмечались только у североамериканских видов: суслика Белдинга (*Spermophilus beldingi*), калифорнийского (*S. beecheyi*) и тринадцатиполосого суслика (*Spermophilus tridecemlineatus*) (Sherman, Morton, 1979; Foltz, Schwagmeyer, 1989; Beollstorff *et al.*, 1994).

Используя данные анализа микросателлитной ДНК, представляется возможным выявление преимуществ в оплодотворении для каждого из самцов. Как показывает анализ, в случае гетеро-

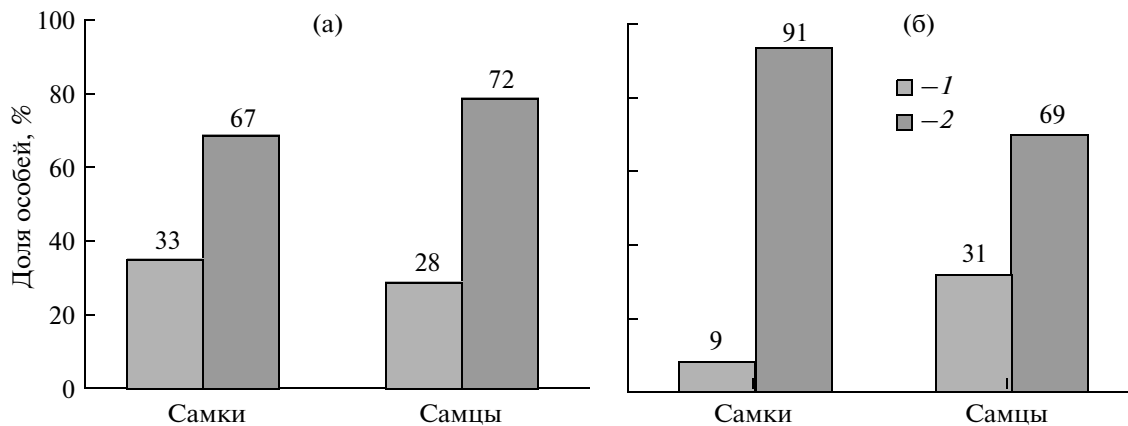


Рис. 2. Репродуктивный успех (а) и успешность размножения (б) разнополюх особей в гибридном поселении большого и желтого сусликов. а: 1 – особи, имеющие более одного детеныша в выводке и более одного спаривания, 2 – все остальные особи, б: 1 – особи, являющиеся родителем более чем одному детенышу, 2 – все остальные особи.

спермных выводков, в среднем $69.6 \pm 10.1\%$ детенышей в выводках принадлежали одному из самцов. Аналогичные результаты были получены для тринадцатиполосого суслика – преимущество в оплодотворении у первого самца было высоким и составляло до 75% детенышей в выводке (Schwagmeier, Parker, 1990).

Анализ репродуктивного успеха особей в гибридном поселении большого и желтого сусликов показал, что в популяции присутствуют особи, которые отличаются большей репродуктивной активностью и успешностью размножения (рис. 2). При этом успешность чаще спаривающихся самцов, почти в два раза выше успешности самок, участвующих в многосамцовых спариваниях.

Как показывают наши данные, максимальный репродуктивный успех самок и самцов отмечается в годы с наименьшей плотностью зверьков в поселении. Таким оказался 2004 г., когда пять размножавшихся особей (три самки и два самца, 7% от общего числа всех размножавшихся зверьков,

$n = 71$) дали 26% прибылых зверьков за все годы наблюдений ($n = 18$). Кроме этого, все особи, у которых был отмечен максимальный репродуктивный успех, являются гибридами (за исключением одной самки большого суслика, 14%), что убедительно доказывает фертильность гибридных особей обоих полов, вопреки бытующему мнению о стерильности гибридов *S. fulvus* и *S. major* (Громов, Ербаева, 1995).

Для определения выживаемости молодых зверьков, после выхода их на поверхность из выводковой норы был проведен анализ происхождения и выживаемости выводков по результатам наблюдений (2004–2008 гг.) и данным анализа микросателлитной ДНК (табл. 1).

Однако данные по среднему числу детенышей в выводках (2.14 ± 0.28 , $n = 28$) указывают на пониженный репродуктивный потенциал гибридных особей, так как этот показатель достоверно ниже такового для родительских видов: 7–14 у *S. major* (Титов, 2003), 4–14 у *S. fulvus* (Мионов,

Таблица 1. Анализ происхождения и выживаемости выводков ($n = 28$) по результатам наблюдений в 2004–2008 гг. в гибридном поселении большого и желтого суслика

Варианты родителей (включая многоотцовые варианты)	Количество выводков, %	Число детенышей		Число выживших детенышей	
		major	гибрид	major	гибрид
♂ <i>S. major</i> × ♀ гибрид (15%)	18	2	2	1	1
♂ <i>S. fulvus</i> × ♀ гибрид (4%)	4	0	1	0	0
♂ гибрид × ♀ <i>S. major</i> (30%)	14	1	3	1	3
♂ гибрид × ♀ гибрид (51%)	64	4	26	0	10
ВСЕГО		7	32	2	14

Таблица 2. Наблюдаемые (*H*) и ожидаемые (*O*) частоты спариваний в различных сочетаниях разнополых особей обоих видов сусликов и их гибридов*

Пары скрещивания	2004 г.		2005 г.		2006 г.		2007 г.		2008 г.	
	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>H</i>	<i>O</i>	<i>H</i>	<i>O</i>
♂ <i>S. major</i> × ♀ <i>S. major</i>	0	0	0	0	1	1.5	0	0	0	0
♂ <i>S. major</i> × ♀ гибрид	0	0	0	0	3	3.4	2	3	3	2.9
♂ гибрид × ♀ гибрид	3	2	11	8.9	8	7.2	7	6	9	7.9
♂ гибрид × ♀ <i>S. major</i>	0	1	1	2.2	3	2.9	0	0	1	2.2
♂ <i>S. fulvus</i> × ♀ <i>S. major</i>	1	0.3	0	0.4	0	0	0	0	0	0
♂ <i>S. fulvus</i> × ♀ гибрид	0	0.7	1	1.5	0	0	0	0	0	0

* По данным наблюдений и микросателлитного анализа ДНК.

1986). Несмотря на это, в гибридном поселении выживаемость гибридного потомства (44%, $n = 32$) оказалась не ниже ($\chi^2 = 0.55$; $p > 0.1$) выживаемости “негибридных” по происхождению детенышей (29%, $n = 7$).

Для изучения направления межвидовых скрещиваний важным показателем является их ассортативность. Сопоставляя результаты наблюдений с ожидаемыми числами спариваний различных по видовой принадлежности особей, можно выявить их сексуальные предпочтения (табл. 2).

Полученные нами данные указывают на отсутствие каких-либо предпочтений. Сравнение ожидаемых и наблюдаемых частот спариваний разных по происхождению особей (2004–2008 гг.) не выявило достоверных различий ($\chi^2 = 0.27-3.51$, $df = 5$, $p > 0.622$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успех размножения является важным показателем, как приспособленности особи, так и устойчивости, и жизнеспособности популяции в целом. Использование данных о репродуктивном успехе особи в исследовании гибридных популяций млекопитающих особенно актуально, поскольку позволяет оценить приспособленность особей разного происхождения, проследить вклад разных категорий особей в генетическую и демографическую структуру смешанной популяции и определить направление и характер происходящей в ней гибридизации.

Репродуктивные отношения сусликов в гибридном поселении большого и желтого сусликов характеризуются неассортативным и неограниченным скрещиванием, множественными спариваниями и отцовством, в том числе гетероспецифичным. По мере накопления в популяции гибридов она приближается к состоянию панмиксичной популяции. Механизмом стабилизации гибридной популяции является повышение общей гетерогенности популяции вследствие свободного скрещива-

ния особей всех категорий и многосамцового типа спаривания до уровня, обеспечивающего проявление автономных генетических процессов.

Анализ изменчивости репродуктивного успеха особей и ее последствий облегчается тем, что генотип каждой особи в гибридной популяции уникален вследствие различных вариантов сочетания генов родительских видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-01304 и в рамках реализации ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (госконтракт № П911 и № 02.740.11.0282).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Громов И.М., Ембаева М.А. Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб.: ЗИН РАН, 1995. 520 с.
- Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. и др. Изучение гибридизации четырех видов сусликов (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) молекулярно-генетическими методами // Генетика. 2002. Т. 38. № 7. С. 950–964.
- Ермаков О.А., Сурин В.Л., Титов С.В. и др. Поиск видоспецифических маркеров в Y-хромосоме и их использование при изучении гибридизации сусликов (*Spermophilus*: Rodentia, Sciuridae) // Генетика. 2006. Т. 42. № 4. С. 538–548.
- Карасева Е.В., Телицына А.Ю. Методы исследования грызунов в полевых условиях. М.: Наука, 1996. 227 с.
- Миронов А.Д. Использование территории желтым сусликом в Заунгузских Каракумах // Природные ресурсы пустынь и их освоение. Ашхабад: Наука, 1986. С. 331–332.
- Титов С.В. Дисперсия молодых в поселениях большого и крапчатого сусликов // Экология. 2003. № 4. С. 289–295.
- Титов С.В., Ермаков О.А., Сурин В.Л. и др. Молекулярно-генетическая и биоакустическая диагностика больших (*Spermophilus major* Pallas, 1778) и желтых (*S. fulvus* Lichtenstein, 1823) сусликов из совместного поселения // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2005. Т. 110. Вып. 4. С. 72–77.

- Титов С.В., Шмыров А.А., Кузьмин А.А. и др. Особенности динамики генетической структуры гибридных популяций млекопитающих (на примере р. *Spermophilus*) // Молекулярно-генетические основы сохранения биоразнообразия млекопитающих Голарктики. М.: КМК, 2007. С. 258–269.
- Arrigi F.E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Exp. Cell. Res. 1968. № 50. P. 47–53.
- Beollstorff D.E., Owings D.H., Penedo M.C., Hersek M.S. Reproductive behaviour and multiple paternity of California ground squirrels // Anim. Behav. 1994. V. 47. № 5. P. 1057–1064.
- Foltz D.W., Schwagmeyer P.L. Sperm competition in the thirteen-lined ground squirrel: differentiation success under field conditions // Amer. Natur. 1989. V. 133. № 2. P. 257–265.
- Goossens B., Graziani L., Waits L. et al. Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis // Behav. Ecol. Sociobiol. 1998. V. 43. P. 281–287.
- Goossens B., Chikhi L., Taberlet P., Waits L., Allaine D. Microsatellite analysis of genetic variation among and within Alpine marmot populations in the French Alps // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 41–52.
- Haynie M.L., Van Den Bussche R.A., Hoogland J.L., Gilbert D.A. Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs // J. Mammal. 2003. V. 84. P. 1244–1253.
- Hunter F.M., Burke T., Watts S.E. Frequent copulations as a method of paternity assurance in the northern fulmar // Anim. Behav. 1992. V. 44. № 1. P. 149–156.
- Krebs J.R., Davies N.B. An Introduction to Behavioural Ecology. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1993. P. 153.
- Lacey E.A., Wiczorek J.R., Tucker P.K. Male mating behaviour and patterns of sperm precedence in Arctic ground squirrels // Anim. Behav. 1997. V. 53. P. 767–779.
- Sherman P.W., Morton M.L. Four months of the ground squirrel // Natur. Hist. 1979. V. 88. № 6. P. 50–57.
- Schwagmeyer P.L., Parker G.A. Male mate choice as predicted by sperm competition in thirteen-lined ground squirrels // Nature. 1990. V. 348. P. 62–64.

Breeding Success and Direction of Animal Crossing in the Hybrid Russet (*Spermophilus major*) and Yellow (*Spermophilus fulvus*) Ground Squirrel Population

A. A. Shmyrov^a, An. A. Kuz'min^b, Al. A. Kuz'min^c, and S. V. Titov^c

^a Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 119071 Russia

^b Penza State Technological Academy, proezd Baidukova/Gagarina 1a/11, Penza, 440605 Russia

^c Belinskii Penza State Pedagogical University, ul. Lermontova 37, Penza, 440026 Russia

e-mail: shm-andrey2005@yandex.ru

Received December 24, 2010

Reproductive relations between animals in the hybrid settlement of the russet and yellow ground squirrels are panmictic and are characterized by the absence of assortative crossings and by the presence of multimale pairings in females with evidently heterospermic broods. Maximum breeding success was observed for hybrid animals proving the fertility of hybrids. However, the hybrid breeding potential (young animal survival rate) is significantly lower as compared with russet and yellow ground squirrels, but the survival rate of the hybrid progeny in the hybrid population is not lower than in specific settlements.