

**PROGESTERONE CONCENTRATIONS IN WILD-CAUGHT
YELLOW-BELLIED MARMOTS**
**КОНЦЕНТРАЦИЯ ПРОГЕСТЕРОНА У ПОЙМАНЫХ
В ПРИРОДЕ ЖЕЛТОБРЮХИХ СУРКОВ**
**CONCENTRATIONS EN PROGESTERONE CHEZ LES MARMOTTES
SAUVAGES À VENTRE JAUNE**

K.B. Armitage¹, K.E. Wynne-Edwards²
К. Б. Армитадж¹, К.Е. Винн-Эдвардс²

¹ Department of Systematics and Ecology, The University of Kansas, Lawrence, Kansas 66045-2106 USA

² Department of Biology, Queen's University, Kingston, Ontario K7L 3N6 Canada.

¹ Факультет систематики и экологии Университета штата Канзас,
Лоуренс, Канзас 666045-2106 США

² Факультет биологии Университета королевы, Кингстон, Онтарио, K7L 3N6 КАНАДА

Abstract

Unlike the majority of small mammals and similar to other Marmotini, female reproduction in *Marmota flaviventris* was characterized by increased progesterone levels during lactation as well as gestation. Elevated levels of progesterone during lactation could be an important component of a feedback mechanism that prevents subsequent ovarian activity and ovulation in this obligate annual breeder. High levels of P4 in non-breeding yearling females suggest that there may be critical priming events in reproduction that occur the year before behavioral estrus. Nipple index is associated with the progesterone cycle and is a good index of breeding or attempted breeding by female marmots.

Key-words: progesterone, nipple index, gestation, lactation.

Резюме

У желтобрюхих сурков, в отличие от большинства представителей Marmotini, во время беременности и лактации падает содержание прогестерона в крови. Повышение концентрации этого гормона, по всей видимости, является механизмом, определяющим подавление активности яйцеклеток и овуляции. Высокий уровень P4 у неразмножающихся годовалых самок подтверждает, что они не способны к размножению в этом возрасте, несмотря на наличие у них эструса. Показатель развития грудных желез связан с циклом выработки прогестерона и является хорошим индикатором способности самок к размножению.

Ключевые слова: прогестерон, индекс развития грудных желез, беременность, лактация.

Résumé

Contrairement à la majorité des petits mammifères, mais comme les autres Marmotini, la reproduction des femelles chez *Marmota flaviventris* est caractérisée par une augmentation des taux de progestérone pendant la lactation ainsi que pendant la gestation. Des taux élevés de progestérone au cours de la lactation pourraient constituer une composante importante d'un mécanisme de rétroaction qui prévient une activité ovarienne et une ovulation ultérieures chez cet animal à reproduction strictement annuelle. Des niveaux élevés de P4 chez des femelles d'un an non reproductrices suggèrent qu'il peut y avoir des événements initiateurs de la reproduction qui se produisent l'année précédant l'oestrus comportemental. L'évolution des mamelons suit le cycle de la progestérone et constitue un bon indice de reproduction ou d'une tentative de reproduction chez les marmottes femelles.

Mots clés : progestérone, indice de reproduction, gestation, lactation.

Introduction

Little is known about seasonal changes of hormonal concentrations of free-ranging mammals. These changes are of particular interest for species of marmots that have a compact active season ranging from about 3.8 to 7.5 months with the remaining time spent hibernating. The role of hormones in reproduction in these hibernators and to what extent it differs from that of other more typically studied rodents rarely has been investigated.

All marmot species reproduce shortly after the termination of hibernation. In our study area, the yellow-bellied marmot (*Marmota flaviventris*) typically breeds in early May. Gestation is estimated to last 30 days and is followed by 3-4 weeks of lactation. Young are weaned in late June or early July. No female yellow-bellied marmot has ever produced more than one litter annually and on average, about 50% of the females aged two or older reproduce each year (Armitage 1986). No yearling female has ever reproduced. A few adult females weaned litters in late July or early August but whether these late litters represent late estrus or multiple estrous cycles is unknown.

This study was conducted to determine progesterone levels in wild-caught yellow-bellied marmots and to compare progesterone concentrations in reproductive and nonreproductive adult females. We also scored nipple development to determine if nipple development and progesterone concentrations were related.

Materials and Methods

During the active seasons of 1989-1993, inclusive, blood samples were taken when marmots were trapped. Methods of trapping, handling, and collecting blood samples are described elsewhere (Armitage 1962, 1974; Schwartz & Armitage 1980, Salsbury & Armitage 1995). Blood samples were centrifuged and the plasma was frozen before being shipped on dry ice to Canada for analysis.

Progesterone determination was based on duplicates at a sample volume of 5 μ l diluted to 1 ml with distilled water, extracted into two volumes of diethyl-ether and dried. Reaction volume was 200 μ l consisting of 100 μ l of progesterone antibody (#337, G. D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, CO) at a working dilution of 1:6000 and 100 μ l of 3 H progesterone at 5000 cpm per tube. After 1 hr of incubation at room temperature, samples were chilled to 4°C for 20 min before adding 750 μ l of Dextran coated charcoal (0.625 g/l charcoal grade Dextran and 6.25 g/l washed charcoal in 0.1 M PBS with 1% gelatin, pH 7.0). Samples were incubated with the charcoal for 20 min then centrifuged at 4°C and 2200xg for 30 min to separate bound from free progesterone. A standard curve ranging from 1.55 to 1550 pg/tube (in duplicate) was included in each assay. Six assays were run between 1990 and 1994. A blood pool at 0.8 mg/ml was used to assess inter-assay variability (6.7%). Intra-assay variability was 10.7%.

At the time of capture, the nipple index of adults females was scored as 3 (nipples visible), 4 (nipples prominent), 5 (nipples swollen), or 6 (lactating). Because the timing of reproduction varies from year to year, the results were standardized to the period of the reproductive cycle. The period of the reproductive cycle was determined by when the young emerged from their natal burrow. Emergence of young was chosen as the time when lactation ended, although some lactation probably continues past the time of juvenile emergence. The reproductive periods that were used in this study are: pre-gestation, gestation, lactation, first-four-weeks post-lactation (I) and second four-weeks post-lactation (II).

When mean values of nipple index or progesterone concentration were determined, a given female was used only once for each reproductive period. If more than one value for a specific female was available, the mean of the values was used. The change in progesterone values over time was plotted weekly (pre-gestation: two weeks; gestation: four weeks; lactation: three weeks; post-lactation: two four-week periods). All values were used for this analysis. If two samples were taken in the same week, the mean of the values was used.

The adult females were divided into three groups: (1) reproductive, those females that weaned a litter, N = 50; (2) non-reproductive, those females that failed to wean a litter and whose nipple index indicated no initiation of reproduction, N = 57; (3) failed-reproduction, females that failed to wean a litter but whose nipple index indicated that reproduction was initiated, N = 10.

Because blood samples were taken only when we could trap an animal, we did not obtain a sample in every week of the reproductive periods for any individual. Therefore, the data represent population trends and the number of samples for each analysis varies. Because nipple index was not always recorded, the number of samples for progesterone concentration and nipple index differs. The trends over time in progesterone concentrations and nipple index for those females from whom we obtained repeated samples did not differ from

HOLARCTIC MARMOTS AS A FACTOR OF BIODIVERSITY
K.B. Armltge, K.E. Wynne-Edwards **PROGESTERONE CONCENTRATIONS ...**

the population trends. A few samples were taken from yearlings, young, and adult males and are reported here but were not included in the statistical analyses. Differences in mean concentrations of progesterone were analyzed by 2-factor and ANOVA to determine if there were an overall effect of reproductive group or stage of reproduction. Because the overall effects were significant (Table 3), the effects of reproductive stage for each reproductive group and differences between reproductive groups for each reproductive stage were tested by one factor ANOVA. Statistically significant differences between means were determined by the Fisher PLSD test and significance is accepted when $p < 0.05$. Differences in the nipple index were analyzed by the Mann-Whitney test. Other comparisons were made by the t-test.

Results

Overall

The concentration of progesterone was significantly affected by both reproductive group and the stage of reproduction (Table 3A). There was no significant interaction between reproductive group and stage of reproduction.

Within reproductive groups

For reproductive females, progesterone concentrations increased from pre-gestation to a peak in early gestation, then decreased during the last two weeks of gestation, then increased to a peak in early lactation and decreased thereafter (Fig. 1). Similarly, progesterone concentrations in female alpine marmots (*M. marmota*) increased from pre-gestation to a peak in gestation in the sixth week after emergence from hibernation, but there were no values reported during lactation (Hackländer 1997). The mean values for gestation and lactation (Table 1) did not differ significantly but were significantly larger than the mean value for post-lactation (Table 3B). Although the mean concentration of pre-gestation was lower than the concentrations of gestation and lactation, the differences were not statistically significant, but probably are biologically significant. Nipple index increased throughout the reproductive period to a peak in lactation and early post-lactation and declined thereafter (Fig. 2). The mean nipple index in gestation was significantly greater than that of pre-gestation ($p = 0.00016$) and the mean index of lactation was significantly greater than the mean index of gestation ($p < 0.00003$).

Table 1.

Progesterone concentrations (ng/ml) for *M. flaviventris*. Values are mean \pm SE (N).
 N = number of animals.

	Pre-gestation	Gestation	Lactation	Post-lactation I	Post-lactation II
Females					
Reproductive	1.31 \pm 0.25(11)	2.43 \pm 0.25(40)	2.57 \pm 0.5(31)	0.84 \pm 0.24(14)	0(6)
Nonreproductive		0.50 \pm 0.12(38)	0.43 \pm 0.08(32)	0.14 \pm 0.05(14)	0(7)
Failed-reproduction		1.63 \pm 0.23(9)	0.51 \pm 0.15(4)	0.48 \pm 0.11(4)	0.33 \pm 0.13(2)
Yearling		0.92 \pm 0.37(6)	4.13 \pm 1.70(8)	0.29 \pm 0.19(4)	0.14 \pm 0.14(4)
Males					
Adult		0.12 \pm 0.05(31)	0.17 \pm 0.05(24)	0.11 \pm 0.05(13)	0(6)
Yearling		0.18 \pm 0.18(4)	0(3)	0.12 \pm 0.12(3)	0.07 \pm 0.07(5)
Juveniles					
					0.18 \pm 0.08(5)

The progesterone concentrations of nonreproductive females peaked during early gestation and declined throughout lactation (Fig. 1). For nonreproductive alpine marmots, progesterone peaked during pre-gestation and declined throughout gestation (Hackländer 1997). The mean progesterone concentrations (Table 1) did not differ significantly among the stages of reproduction (Table 3C). Nipple index evidenced no pattern of change (Fig. 1) and was relatively low throughout the reproductive season (Table 2). Nipple index did not change significantly from gestation to lactation ($p = 0.37$) or from lactation to post-lactation ($p = 0.32$).

The progesterone concentration of failed-reproduction females was high in early gestation, then declined to a low in early lactation, increased to a peak in late lactation, and declined thereafter (Fig. 1). Mean

СУРКИ ГОЛАРКТИКИ КАК ФАКТОР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
К.Б. Армиейдж, К.Е. Винн-Эдвардс **КООНЦЕНТРАЦИЯ ПРОГЕСТЕРОНА ...**

progesterone concentrations were significantly higher during gestation than during lactation and post-lactation (Tables 1, 3D). Nipple index (Table 2) did not change significantly between gestation and lactation ($p = 0.27$) or between lactation and post-lactation ($p = 0.26$).

Table 2.

Nipple index ($\bar{x} \pm SE(N)$) for adult female yellow-bellied marmots (*M. flaviventris*).
 N = number of females.

	Pre-gestation	Gestation	Lactation	Post-lactation
Reproductive	3.38±0.18(8)	4.33±0.09(38)	5.66±0.09(32)	5.73±0.14(11)
Nonreproductive		3.17±0.07(34)	3.22±0.07(32)	3.31±0.13(13)
Failed-reproduction		4.43±0.16(9)	4.67±0.33(3)	4.0±1.0(3)

Table 3.

ANOVA analysis of mean progesterone concentrations
 for adult female yellow-bellied marmots.

Source	df	F	p
<i>A. Overall effect</i>			
Reproductive group (A)	2	21.3	0.0001
Stage of reproduction (B)	2	4.1	0.0179
Interaction (A) (B)	4	1.7	0.1602
<i>B. Reproductive females</i>			
Stage of reproduction	3	3.5	0.0175
<i>C. Non-reproductive females</i>			
Stage of reproduction	2	2.0	0.1407
<i>D. Failed-reproductive females</i>			
Stage of reproduction	2	9.1	0.003
<i>E. Gestation</i>			
Reproductive group	2	25.5	0.0001
<i>F. Lactation</i>			
Reproductive group	2	10.0	0.0002
<i>G. Post-lactation</i>			
Reproductive group	2	4.5	0.0201

Between reproductive groups

The reproductive females had significantly higher mean progesterone concentrations than the nonreproductive females throughout the reproductive periods (Tables 1, 3E-G). Reproductive female alpine marmots had higher concentrations of progesterone than did nonreproductive females (Hackländer 1997). The reproductive females had significantly higher mean progesterone concentrations than the failed-reproduction females during lactation but not during gestation or post-lactation (Tables 1, 3). The failed-reproduction females had significantly higher progesterone concentrations than the non-reproductive females during gestation, but not during lactation or post-lactation (Table 1, 3).

The nipple index of the reproductive females (Table 2) was significantly larger than that of the nonreproductive females during gestation ($p < 0.00003$), lactation ($p < 0.00003$), and post-lactation ($p = 0.00011$). The nipple index of reproductive and failed-reproduction females did not differ significantly during gestation ($p = 0.48$) but nipple index of reproductive females was significantly greater during lactation ($p = 0.011$). Although the nipple index of reproductive females was much greater than that of failed-reproduction females during post-lactation (Table 2), the difference was not statistically significant ($p = 0.123$). However, that lack of statistical significance probably is a consequence of the small sample sizes and the difference likely is

biologically significant given that the reproductive females weaned litters and the failed-reproduction females did not. The nipple index of failed-reproduction females was significantly larger than that of nonreproductive females during gestation ($p < 0.00003$) and lactation ($p < 0.0044$), but not during post-lactation ($p = 0.37$).

Other age-sex groups

Progesterone was detected in adult and yearling males, in yearling females, and in juveniles (Table 1). Only yearling females had relatively high values, which occurred during lactation (Table 1). We controlled for any sampling bias that could occur because of small sample size and possible among year effects by comparing the progesterone concentrations during lactation in 1990 for reproductive females ($\bar{x} = 4.93$, $SE = 1.6$, $N = 8$) and yearling females ($\bar{x} = 5.48$, $SE = 1.97$, $N = 6$). The means did not differ statistically ($t = 0.22$, $p > 0.9$).

Of the 105 determinations on adult males, 83 were recorded as 0.0, i.e., were below the detectable level of 2.6 ng/ml. The progesterone concentrations of adult males were compared to those of nonreproductive females, which was the group of females that had the lowest mean concentrations. The mean values for adult males were significantly lower during the time periods of gestation ($t = 2.8$, $p < 0.01$) and lactation ($t = 3.2$, $p < 0.01$). However, the mean progesterone concentrations of adult males and nonreproductive females did not differ statistically during the post-lactation time period ($t = 0.63$, $p > 0.5$). This result is not surprising given that progesterone levels reached zero for nonreproductive females at this time (Fig. 1) and levels for other adult female groups were declining. However, for the reproductive and failed-reproduction females, the concentrations of progesterone were significantly greater ($t = 3.0$, $p < 0.01$, for both groups). Because the other sex-age groups were represented by small samples and the samples were not systematically collected through the active season, further statistical comparisons are not appropriate.

Discussion

Although progesterone was present in all age-sex groups, it clearly increases during female reproduction (Fig. 1, Table 1). The pattern of progesterone concentration, which had two peaks, one during gestation and one during lactation, was not that considered to be typical of mammals. Progesterone is important in maintaining pregnancy (Nelson 1995:52), declines prior to parturition (Jameson 1988:167) and remains low during lactation. The decline in late pregnancy occurred in reproductive *M. flaviventris*, but, in contrast to the typical pattern, progesterone increased to a higher peak level during lactation.

Similar changes in progesterone concentration occurred in the woodchuck, *M. monax* (Concannon et al 1983, 1984) and in the California ground squirrel, *Spermophilus beecheyi* (Holekamp et al 1988). High levels of progesterone occurred in three post-parturient black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) and progesterone levels remained high for several weeks after the initiation of estrus in unmated females (Foreman & Garris 1984). Progesterone secretion continues during lactation as a consequence of the maintenance or rejuvenation of the corpora lutea (Concannon et al 1984). The corpora lutea of *S. tridecemlineatus* persist for several weeks post-parturition and begin to show fatty infiltration after weaning (Foster 1934).

These species are all annual breeders in the family *Sciuridae* and the tribe *Marmotini* (Black 1963). The high progesterone levels during lactation may be a factor that limits the number of yearly cycles (Foreman & Garris 1984) or may inhibit ovarian activity to prevent ovulation that could interfere with milk production. By contrast, the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*), a member of the tribe *Sciurini*, breeds twice yearly and progesterone decreases sharply after parturition (Tait et al 1981). Similarly, in the social collared peccary (*Tayassu tajacu*), a yearlong breeder, progesterone declined at the time of birth (Hellgren et al 1985).

Although the black-tailed prairie dog is not a true hibernator, it may remain below ground for several days at a time during cold weather and loses mass during the winter (Hoogland 1996). The remaining *Marmotini* hibernate. Individuals that do not gain adequate mass prior to emergence do not survive hibernation (Armitage et al 1976, Armitage 1994). Late reproduction or an attempt at a second litter almost certainly leads to death during hibernation. Thus, physiological mechanisms that restrict ovarian activity to the vernal breeding period should be favored by natural selection.

The high levels of progesterone in non-breeding female yearlings suggest that there may be critical priming events that occur in the year prior to behavioral estrus. Also, the progesterone may play a role of integrating the reproductive cycle into the overall annual cycle. Because two-year old *M. flaviventris* can reproduce, they likely reach reproductive maturity by the time they hibernate at the end of their yearling (second) summer. The high levels of progesterone may prevent non-adaptive estrus late in the yearling summer.

Only reproductive females had a high nipple index, thus verifying that the nipple index is a good external

character for assessing reproductive activity. The consistent low progesterone concentration and low nipple index in nonreproductive females, the higher nipple index and progesterone concentrations in the failed-reproduction females, and the high nipple index and progesterone concentrations of reproductive females suggest that progesterone plays a role in nipple development.

Acknowledgements

This work was partially supported by NSF Grants BSR-8614690, BSR-9006772, and BSR-9107543 to KBA and an NSERC operating grant to KEW-E. Kevin C. Armitage, Dennis W. Johns, and Carmen M. Salsbury assisted with trapping and collecting blood samples; Zou Zou Kuzyk and Charlotte Tweedie assisted with RIA.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Armitage K.B. 1962. Social behaviour of a colony of the yellow-bellied marmot (*Marmota flaviventris*). *Anim. Behav.* 10:3 19-331.
- Armitage K.B. 1974. Male behaviour and territoriality in the yellow-bellied marmot. *J. Zool., Lond.* 172: 233-265.
- Armitage K.B. 1986. Marmot polygyny revisited: determinants of male and female reproductive strategies. pp. 303-331 In D. S. Rubenstein & R. W. Wrangham, eds. *Ecological Aspects of Social Evolution*. Princeton University Press, Princeton.
- Armitage K.B. 1994. Unusual mortality in a yellow-bellied marmot population. pp. 5-13 In V. Yu. Rumiantsev, ed. *Actual Problems of Marmots Investigation*. ABF Publishing House, Moscow.
- Armitage K.B., J.F. Downhower & G.E. Svendsen. 1976. Seasonal changes in weights of marmots. *Am. Midl. Nat.* 96: 36-51.
- Black C.C. 1963. A review of the North American Tertiary Sciuridae. *Bull. Mus. Comp. Zool., Harvard* 130: 109-248.
- Concannon P., B. Baldwin, J. Lawless, W. Hornbuckle & B. Tennant. 1983. Corpora lutea of pregnancy and elevated serum progesterone during pregnancy and post-partum anestrus in woodchucks (*Marmota monax*). *Biol. Reprod.* 29: 1128-1134.
- Concannon P., B. Baldwin & B. Tennant. 1984. Serum progesterone profiles and corpora lutea of pregnant, postpartum, barren and isolated females in a laboratory colony of woodchucks (*Marmota monax*). *Biol. Reprod.* 30: 945-951.
- Foreman D. & D. Garris. 1984. Plasma progesterone levels and corpus luteum morphology in the female prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 55: 315-322.
- Foster M.A. 1934. The reproductive cycle in the female ground squirrel, *Citellus tridecemlineatus* (Mitchell). *Am. J. Anat.* 54: 487-506.
- Hackländer K. 1997. Der Einfluss der Kondition, des Lebensalters und sozialer Faktoren auf die Fertilität bei Alpenmurmeltierweibchen (*Marmota marmota*). *Diplomarbeit Fachbereich Biol. Philipps-Univ. Marburg*. 61 pp.
- Hellgren E.C., R.L. Lochmiller, M.S. Amoss Jr. & W.E. Grant. 1985. Serum progesterone, estradiol-17B, and glucocorticoids in the collared peccary during gestation and lactation as influenced by dietary protein and energy. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59: 358-368.
- Holekamp K.E., S. Nunes & F. Talamantes. 1988. Patterns of progesterone secretion in free-living California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Biol. Reprod.* 39: 1051-1059.
- Hoogland J.L. 1996. *Cynomys ludovicianus*. *Mamm. Species* 535: 1-10.
- Jameson E.W. Jr. 1988. *Vertebrate Reproduction*. John Wiley & Sons, N.Y. 526 pp.
- Nelson R.J. 1995. *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. 611 pp.
- Salsbury C.M. & K.B. Armitage. 1995. Reproductive energetics of adult male yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Can. J. Zool.* 73:1791-1797.
- Schwartz O.A. & K.B. Armitage. 1980. Genetic variation in social mammals: the marmot model. *Science* 207:665-667.
- Tait A.J., G.S. Pope & E. Johnson. 1981. Progesterone concentrations in peripheral plasma of non-pregnant and pregnant grey squirrels (*Sciurus carolinensis*). *J. Endocr.* 89:107-116.

FIGURES / РИСУНКИ

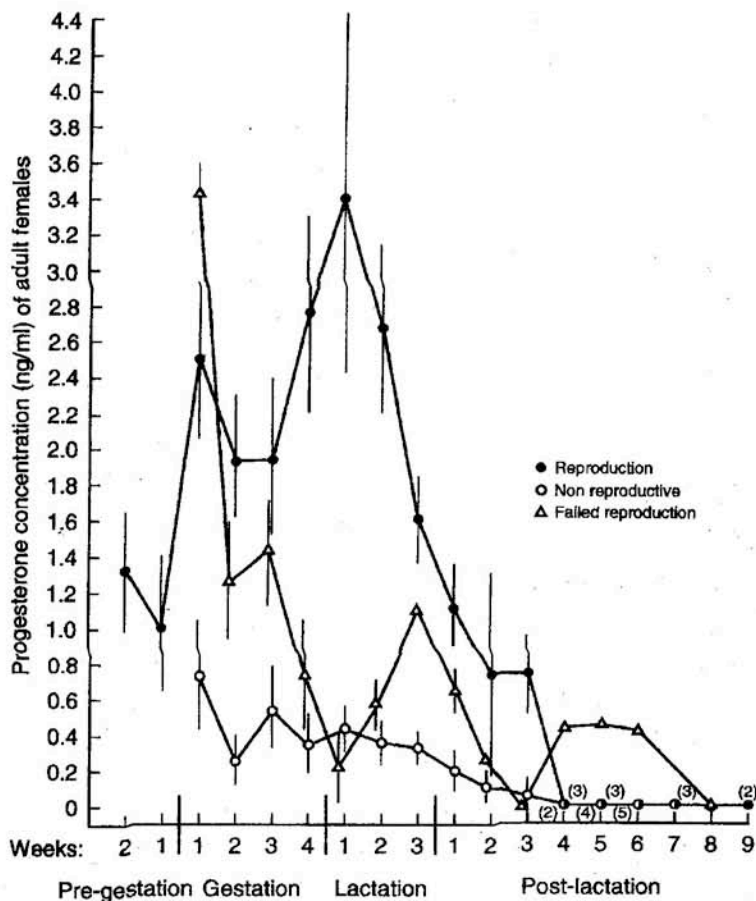
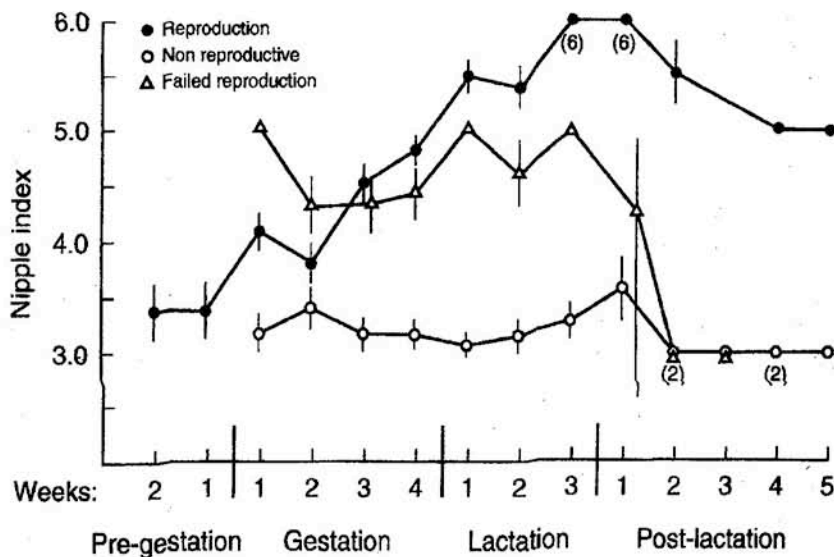


Fig. 1. Seasonal change in mean progesterone concentration of adult female yellow-bellied marmots, *M. flaviventris*. Vertical bars = 1 standard error. Where vertical bars are absent, N = 1 except for those points where N is in parentheses. The numbers above the line: N for reproductive females; numbers below the line: N for non-reproductive females.

Рис. 1. Сезонные изменения средней концентрации прогестеронов у взрослых самок желтобрюхого сурка, *M. flaviventris*. Вертикальные столбики = 1 стандартная ошибка. Там, где их нет, N = 1, кроме точек, где N в скобках. Цифры над линией: N для размножающихся самок; цифры под линией: N для неразмножающихся самок.

Fig. 2. Seasonal change in mean nipple index of adult female yellow-bellied marmots, *M. flaviventris*. Vertical bars = 1 standard error. Where vertical bars are absent, N = 1 except for those points where N is in parentheses.

Рис. 2. Сезонные изменения среднего индекса развития грудных желез у взрослых самок желтобрюхого сурка, *M. flaviventris*. Вертикальные столбики = 1 стандартная ошибка. Там, где их нет, N = 1, кроме точек, где N в скобках.



Translated into Russian by I.V. Rymalov
Перевод на русский язык И.В. Рымалова

Введение

Динамика гормонов в крови млекопитающих в природе изучена недостаточно. Исследования этой динамики у сурков представляют особый интерес, т.к. они являются зимоспящими животными и проводят в спячке от 3 до 7.5 месяцев в году. По всей видимости, роль гормонов у зимоспящих животных отличается от таковой у других (не зимоспящих) грызунов, которые в основном были объектами исследований.

Все виды сурков начинают размножаться сразу же после окончания спячки. В исследуемой нами популяции желтобрюхих сурков (*M. flaviventis*) размножение происходит обычно в начале мая. Беременность продолжается 30 дней, а лактация 3-4 недели. Молодняк выходит из нор в конце июня - начале июля. Ни одна самка не дает в год больше одного выводка, и лишь 50% самок в возрасте два года и старше размножаются каждый год (Armitage, 1986). Не отмечено ни одного случая размножения у годовалых самок. Некоторые взрослые самки приносят выводки в конце июля - начале августа. Однако, причина такого позднего размножения неизвестна. Она может заключаться как в позднем эструсе, так и в возможности существования многократных эструсов.

Настоящее исследование проведено с целью определения уровня содержания прогестерона в крови желтобрюхих сурков в природе и сравнения концентрации прогестерона у размножающихся и неразмножающихся взрослых самок. Также мы определяли индекс развития грудных желез с целью поиска связей этого показателя с уровнем концентрации прогестерона.

Материалы и методика

Кровь у сурков брали во время их животолова в период наземной активности зверей в 1989-1993 гг. Методы отлова, взятия крови и содержания пойманных животных подробно описаны нами в других статьях (Armitage, 1962, 1974; Schwartz, Armitage, 1980; Salsbery, Armitage, 1995). Пробы крови центрифугировали, замораживали в сухом льду и отправляли в Канаду для анализа.

Концентрацию прогестерона определяли дважды, добавляя 5 мл. сыворотки крови к 1 мл. дистиллированной воды, экстрагируя их в двух объемах диэтилового эфира и высушивая. Для реакции использовали стандартный объем - 200 мл., состоящий из 100 мл. антигена к прогестерону (#337, G.D. Niswender, Colorado State University, Fort Collins, CO) в рабочей концентрации 1/6000 и 100 мл. 3Н прогестерона 5000 смр в каждой ампуле. После одного часа инкубации при комнатной температуре пробы охлаждали до 40С в течение 20 минут перед добавлением 750 мл. декстрана в активированном угле (0.625 г/л растворенного в угле декстрана и 6.25 г/л суспензии угля в 1 моле PBS с 1% желатина и рН=7%). Пробы активировались с углем в течении 20 минут, затем их центрифугировали при температуре 40С в течении 30 минут при ускорении 2200g в течении 30 минут с целью выделения свободного прогестерона. Стандартная кривая распределения находилась в области от 1.55 до 1550 pg в каждой пробирке при двукратных независимых определениях. Шесть анализов было проведено в 1990 и 1994 годах. Пул с концентрацией сывороток 8 мг/мл был использован для оценки изменчивости в выборке (6.7%). Она составляла 10.7%.

Во время отлова индекс развития молочных желез у взрослых самок фиксировали по балльной оценке - 3 молочные железы заметны, 4 - молочные железы набухшие, 5 - сильно набухшие, 6 - лактация. Поскольку время массового размножения каждый год отличалось, то расчет вели по периоду размножения, а не по календарным показателям. За точку отсчета брали день, когда молодняк впервые

выходил из норы. Мы считали, что в этот период лактация заканчивается, хотя некоторые самки продолжали лактировать некоторое время после выхода молодых из норы. Стадии, которые в настоящем исследовании мы использовали для характеристики размножения, мы определяли как: подготовка к беременности, беременность, лактация, четыре недели после ее окончания (пост-лактация I) и следующие четыре недели (пост-лактация II).

Каждую самку, у которой определяли показатели развития молочных желез или концентрацию прогестерона, обследовали один раз в течении одной такой стадии. Лишь немногих самок удавалось обследовать многократно во время каждой такой стадии. Изменения прогестерона рассчитывали для каждой самки, определяли еженедельно: подготовка к беременности - 2 недели, беременность - 4 недели, лактация - 3 недели, пост-лактация I и пост-лактация II по 4 недели. Для анализа использовали все полученные данные. Если кровь брали дважды за неделю, то использовали среднее значение.

Взрослых самок разделяли на три группы: (1) размножавшихся, которые принесли выводок - $N = 50$, (2) неразмножавшихся, которые не рожали, чей индекс развития молочных желез указывал на отсутствие подготовки к размножению - $N = 57$ и (3) неразмножавшихся самок с развитыми молочными железами, показывающими их готовность к размножению, т.е. самок с нарушенным размножением - $N = 10$. Пробы крови брали во время животоплава. Естественно, нам не удавалось отлавливать каждую самку еженедельно, поэтому величина еженедельных выборок при определении тенденции изменений отличается. Поскольку индекс развития молочных желез при поимках регистрировался не всегда, количество данных по этому показателю также отличается от количества проб прогестерона. Данные по анализам концентрации прогестерона и индексам развития молочных желез у самок, которых обследовали многократно в течение одного периода размножения, не нарушают тенденции динамики этих показателей в популяции. Несколько проб и данных по индексам, взятые у сеголетов, годовалых и взрослых самцов, представлены в этом исследовании, но не использованы при общем статистическом анализе. Разница концентрации прогестерона проанализирована способами 2х-факторного анализа и ANOVA для того, чтобы определить, было ли это общим эффектом размножающейся группы или общим показателем для каждой стадии размножения. Поскольку картина общего популяционного эффекта была очень показательной (табл. 3), то разницу между различными группами и стадиями для каждой группы самок рассчитывали, используя только один способ ANOVA. Разницу между значениями определяли по критерию Фишера PLSD и считали ее достоверной при $p < 0.05$. Разницу между индексами развития молочных желез анализировали, используя тест Mann-Whitney. Для сравнения применяли t-критерий.

Результаты

Общие замечания

Концентрация прогестерона значительно отличалась как между группами размножающихся самок, так и у одной группы на разных фазах размножения (табл. 3А). Перекрывающихся показателей при сравнении групп и стадий не отмечали.

Динамика показателей у разных групп взрослых самок

У размножающихся самок концентрация прогестерона увеличивалась, достигая пика в начале беременности, а затем уменьшалась в течении последних двух недель этой стадии, затем вновь увеличивалась, достигая максимальных показателей при начале лактации, а затем вновь снижалась (рис. 1). Похожая динамика концентрации прогестерона отмечена у самок альпийского сурка, у которых количество прогестерона в крови увеличивалось в течение первых шести недель после окончания спячки. Однако, в литературе нет данных о динамике этого гормона у них во время лактации (Hacklander, 1997). Средние значения при беременности и лактации существенно не отличались (табл. 1), но они были значительно выше, чем средние значения после окончания лактации (табл. 3В). Средние значения концентрации прогестерона до беременности не отличались статистически достоверно от таковых при беременности и лактации, но все же можно предположить, что это статистически недостоверное различие имеет определенное биологическое значение. Индекс развития молочных желез у размножающихся самок увеличивался, достигая пика к концу лактации и во время первых дней после ее окончания, а затем уменьшался (рис. 2). Среднее значения показателя индекса развития молочных желез во время беременности было значительно выше, чем на предыдущей стадии ($p = 0.00016$), а во время лактации значительно выше чем при беременности ($p < 0.00003$).

СУРКИ ГОЛАРКТИКИ КАК ФАКТОР БИОРАЗНООБРАЗИЯ
К.Б. Армיתейдж, К.Е. Винн-Эдвардс **КООНЦЕНТРАЦИЯ ПРОГЕСТЕРОНА ...**

Таблица 1.

Концентрация прогестеронов (ng/ml) у *M. flaviventris*.
 Значения - среднее \pm SE(N). N = число животных.

	Предбере- менность	Беремен- ность	Лактация	Пост- лактация I	Пост- лактация II
Самки					
Размножающиеся	1.31 \pm 0.25(11)	2.43 \pm 0.25(40)	2.57 \pm 0.5(31)	0.84 \pm 0.24(14)	0(6)
Неразмножающиеся		0.50 \pm 0.12(38)	0.43 \pm 0.08(32)	0.14 \pm 0.05(14)	0(7)
С нарушенным размножением		1.63 \pm 0.23(9)	0.51 \pm 0.15(4)	0.48 \pm 0.11(4)	0.33 \pm 0.13(2)
Годовальные		0.92 \pm 0.37(6)	4.13 \pm 1.70(8)	0.29 \pm 0.19(4)	0.14 \pm 0.14(4)
Самцы					
Взрослые		0.12 \pm 0.05(31)	0.17 \pm 0.05(24)	0.11 \pm 0.05(13)	0(6)
Годовальные		0.18 \pm 0.18(4)	0(3)	0.12 \pm 0.12(3)	0.07 \pm 0.07(5)
Сеголетки					
					0.18 \pm 0.08(5)

У неразмножающихся самок концентрация прогестерона увеличивалась во время периода, соответствующего подготовке к размножению, и достигала своего пика, когда беременность размножающихся самок только начиналась. Затем она уменьшалась во время периода, соответствующего лактации (рис. 1). Для неразмножающихся самок альпийских сурков отмечены пик концентрации гормона во время периода подготовки к размножению и ее снижение во время периода, соответствующего беременности (Hacklander, 1997). Средние значения концентрации прогестерона не отличались на различных фазах размножения (табл. 3С). Индекс развития молочных желез у этой группы взрослых самок не изменялся и был довольно низким в течение всего периода размножения (рис. 1, табл. 2).

Таблица 2.

Индекс развития грудных желез ($x \pm$ SE(N)) у взрослых самок желтобрюхого сурка (*M. flaviventris*). N = число самок.

	Предбере- менность	Беремен- ность	Лактация	Пост- лактация
Размножающиеся	3.38 \pm 0.18(8)	4.33 \pm 0.09(38)	5.66 \pm 0.09(32)	5.73 \pm 0.14(11)
Неразмножающиеся		3.17 \pm 0.07(34)	3.22 \pm 0.07(32)	3.31 \pm 0.13(13)
С нарушенным размножением		4.43 \pm 0.16(9)	4.67 \pm 0.33(3)	4.0 \pm 1.0(3)

Концентрация прогестерона в крови самок третьей группы была высокой на фазе, соответствующей ранней беременности, затем она уменьшалась до начала периода лактации, затем снова увеличивалась, достигая пика к концу этого периода, а затем снова снижалась (рис. 1). Средние значения концентрации прогестерона были у этих самок значительно выше во время периода, соответствующего беременности, чем во время периодов, соответствующих лактации и после нее у рожавших самок (табл. 1, рис. 3D). Индекс развития молочных желез во время периодов, соответствующих беременности, лактации и стадиям после ее окончания практически не отличался. Между первым и вторым периодом статистические различия составляли $p = 0.27$, между вторым и третьим - $p = 0.26$.

Таблица 3.

Анализ средней концентрации прогестерона
 у взрослых самок желтобрюхого сурка методом ANOVA

Источник	df	F	p
<i>A. Общий эффект</i>			
Репродуктивная группа (A)	2	21.3	0.0001
Стадия размножения (B)	2	4.1	0.0179
Взаимодействие (A) (B)	4	1.7	0.1602
<i>B. Размножающиеся самки</i>			
Стадия размножения	3	3.5	0.0175
<i>C. Неразмножающиеся самки</i>			
Стадия размножения	2	2.0	0.1407
<i>D. Самки с нарушенным размножением</i>			
Стадия размножения	2	9.1	0.003
<i>E. Беременность</i>			
Репродуктивная группа	2	25.5	0.0001
<i>F. Лактация</i>			
Репродуктивная группа	2	10.0	0.0002
<i>G. Постлактация</i>			
Репродуктивная группа	2	4.5	0.0201

Различия между группами взрослых самок

Концентрация прогестерона в крови размножающихся самок была значительно выше, чем у неразмножающихся в течении всего периода размножения (табл. 1, 3E-G). Для взрослых самок альпийского сурка отмечены такие же отличия (Hacklander, 1997). У третьей группы взрослых самок концентрация гормона в крови была значительно ниже во время периода лактации размножавшихся самок, однако во время, соответствующее периоду беременности и постлактационному периоду, концентрация прогестерона в крови у этих двух групп не отличалась (табл. 1, 3). Концентрация гормона в крови у самок, потерпевших неудачу в размножении, была выше, чем у неразмножавшихся во время периода, соответствующего беременности, но не отличалась во время лактации и после нее (табл. 1, 3).

Индекс развития молочных желез у размножающихся самок был значительно выше, чем у неразмножающихся как во время периода беременности ($p < 0.00003$), так и во время лактации ($P < 0.00003$) и после нее ($p = 0.00011$). Во время периода беременности индекс развития молочных желез у размножавшихся самок и самок с нарушенным размножением практически не отличался ($p = 0.48$). Однако, во время лактации у первых он был значительно выше ($p = 0.011$). Хотя очевидно, что индекс развития молочных желез у рожавших самок в пост-лактационный период был выше, статистический анализ показал отсутствие достоверных различий ($p = 0.123$). По всей видимости, отсутствие статистических различий связано не с биологическими фактами, т.к. ясно, что рожавшие самки выкармливали молодняк, а с небольшим размером выборок групп животных. Индекс развития грудных желез у самок с нарушенным размножением был значительно выше, чем у неразмножавшихся во время беременности ($p < 0.00003$) и лактации ($p < 0.0044$), во время постлактационного периода он практически не отличался ($p = 0.37$).

Другие поло-возрастные группы

Прогестерон определяли в крови у взрослых и годовалых самцов, годовалых самок и сеголеток (табл. 1). Только у годовалых самок отмечали относительно высокие показатели концентрации гормона во время периода, соответствующего периоду лактации у взрослых самок (табл. 1). При анализе этих групп мы очень внимательно относились к оценке каждого образца, т.к. величина выборок была

небольшой, а на результаты в свою очередь могли оказать влияние эффекты, связанные с различными годовыми отклонениями в биологии животных. Так, например, сравнение концентрации прогестерона во время периода лактации в 1990 г. у взрослых размножающихся ($x = 4.93$, $SE = 1.6$, $N = 8$) и годовалых ($x = 5.48$, $SE = 1.97$, $N = 6$) самок не показало статистически достоверных отличий ($t = 0.22$, $p > 0.9$).

У 83 взрослых самцов из 105 обследованных концентрация прогестерона была определена как 0.0, т.к. она была ниже порогового уровня определения - 2.6 нг/мл. Показатели концентрации прогестерона в крови взрослых самцов сравнивали с концентрацией гормона в крови нерожавших самок (минимальные показатели среди самок). Средние значения у самцов во время периодов, соответствующих беременности и лактации, были значительно ниже. Во время лактации статистические различия составляли $t = 3.2$, $p < 0.01$, а во время беременности $t = 2.8$, $p < 0.01$. Во время постлактационного периода показатели концентрации гормона в крови взрослых самцов и нерожавших самок не отличались ($t = 0.63$, $p > 0.5$). Этот результат не удивителен, т.к. в постлактационный период у нерожавших самок концентрация гормона в крови падает практически до 0 (рис. 1), а уровень концентрации в крови других групп взрослых самок также резко уменьшается, хотя следует отметить, что у последних она значительно выше. Сравнение двух групп (самцы и нерожавшие самки) с остальными взрослыми самками показывает статистически достоверные различия ($t = 3.0$, $p < 0.01$). Нам не удалось собрать достаточного количества проб крови для проведения статистического анализа сравнения концентрации прогестерона у сурков других половозрастных групп.

Обсуждение

Присутствие прогестерона в крови отмечено для всех групп взрослых сурков (рис. 1, табл. 1). Оно, очевидно, увеличивается во время сезона размножения. Динамику концентрации прогестерона в крови с двумя пиками (один - во время беременности, другой во время лактации) нельзя считать типичной для млекопитающих. В литературе отмечалась важность этого гормона для сохранения беременности (Nelson, 1952, с.52), уменьшение его концентрации перед родами (Jamson, 1988, с.167) и сохранение ее на низком уровне во время лактации. У размножающихся сурков *M. flaviventris* также отмечено снижение концентрации гормона на последней фазе беременности, однако нетипичным является рост концентрации прогестерона с ее пиком во время лактации.

Похожая картина динамики прогестерона в крови отмечена для *M. monax* (Concannon et al., 1983, 1984) и калифорнийских земляных белок *Spermophilus beecheyi* (Holekamp et al., 1988). Высокий уровень прогестерона отмечали в крови чернохвостых луговых собачек (*Cynomys ludovicanus*), для них также отмечено сохранение высокой концентрации гормона у неразмножающихся самок в течении нескольких недель после провоцированного эструса (Formen, Garris, 1984). Наличие секреции прогестерона во время лактации является последствием поддержания или восстановления желтых тел (Concannon et al., 1983). Желтые тела у *S. tridecemlineatus* не разбиваются в течение нескольких недель после родов и начинают жировую инфильтрацию только после появления выводка (Foster, 1934).

Все эти виды, как и все, принадлежащие к семейству Беличьих, трибе *Marmotini*, размножаются только один раз в году (Black, 1963). Высокий уровень концентрации прогестерона может быть фактором, который ограничивает число эструсов, т.е. лимитирует один годовой цикл (Formen, Garris 1984). Также возможно, что этот фактор подавляет овуляцию, которая может отрицательно повлиять на продукцию молока у самок при лактации. Напротив, у серых белок (*Sciurus carolinensis*), принадлежащих к трибе *Sciurini*, размножающихся в году дважды, концентрация прогестерона резко падает сразу же после родов (Tait et al 1981). Также у пекари (*Tayassu tajacu*), размножающегося круглый год, концентрация прогестерона уменьшается во время размножения (Hellgren et al., 1985).

Хотя чернохвостые луговые собачки и не принадлежат к группе зимоспящих животных, они часто могут не выходить из норы в холодные и непогожие дни, и за время зимы значительно теряют в весе (Hoogland., 1996). Вернемся к зимоспящим *Marmotini*. Животные, масса тела которых невелика перед спячкой, не выживают зимой (Armitage et al., 1974; Armitage, 1994). Позднее размножение и попытка подготовки ко второму размножению в течение одного лета также могут обусловить смерть животного во время спячки. Таким образом, среди животных в популяции идет естественный отбор физиологических механизмов, которые ограничивают образование яйлеклеток коротким периодом.

Высокий уровень содержания прогестерона в крови неразмножающихся годовалых самок позволяет предположить, что этот механизм не дает им размножаться до начала реальной половой зрелости. Возможно также, что этот механизм может определять интеграцию (сроки) периода размножения в годовом цикле сурков. Мы делаем такое предположение, потому что среди двухлетних,

способных к размножению желтобрюхих сурков иногда встречаются животные, которые продолжают находиться в спячке до конца второго лета их жизни. Такое положение может быть обусловлено высоким содержанием прогестерона в крови предыдущим летом, которое определяет запаздывание эструса.

Наиболее высокий индекс развития молочных желез отмечается у рожавших самок, этот показатель может служить хорошей внешней характеристикой участия животных в размножении. Постоянно низкий уровень прогестерона в крови нерожавших самок и низкий индекс развития молочных желез у этих животных, а также тот факт, что концентрация гормона у самок с нарушенным размножением выше, и то, что наиболее высокие показатели концентрации прогестерона и индекса развития молочных желез отмечены у размножающихся самок, свидетельствуют о том, что прогестерон играет роль в развитии молочных желез.

Благодарности

Эта работа частично поддержана грантами NSF BSR-8614690, BSR-9006772, BSR-9102743 KBA и оперативным грантом NSERC KEW-E. Кевин С. Армтейдж, Денис В. Джонс и Кармен М. Солсбери помогли мне при отлове животных и взятии крови. Зоу Зоу Казык и Черот Твиди ассистировали при определении RIA.