

ЕВРОАЗИАТСКАЯ РЕГИОНАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ ЗООПАРКОВ И
АКВАРИУМОВ
EUROASIAN REGIONAL ASSOCIATION OF ZOOS AND AQUARIA

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
GOVERNMENT OF MOSCOW

МОСКОВСКИЙ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ПАРК
MOSCOW ZOO

Научные исследования в
зоологических парках
Scientific Research in Zoological
Parks

Выпуск 18
Volume 18

Москва
Moscow

2005

Определение пола кубинских свистящих уток *Dendrocygna arborea* по ответам на трансляцию видовых криков

И.А. Володин^{1,2}, Е.В. Володина², В.А. Матросова¹, М.В. Холодова³

¹ Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,

² Московский зоопарк,

³ Институт Проблем Экологии и Эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Введение

Поскольку самки и самцы всех восьми видов свистящих уток (род *Dendrocygna*) внешне никак не различаются ни по окраске, ни по размерам (Johnsgard, 1965; Petrie, Rogers, 1997), определение пола у этой группы представляет определенные сложности (Володин и др., 2003). До недавнего времени в распоряжении сотрудников зоопарка были только инвазивные способы (такие как клоакальная инспекция и генетический анализ образцов крови и перьев). Недостатки этих методов – необходимость отлова птиц, требования высокой квалификации и опыта от лиц, проводящих процедуры, а также длительные сроки проведения исследований и необходимость специального оборудования для проведения генетических исследований. Это часто приводит к тому, что в зоопарках, которые содержат от одной до нескольких особей какого-либо из видов свистящих уток, их пол вообще не определяют, поскольку трудовые и временные затраты не оправдывают себя.

Свою лепту вносит также недоверие к данным методам из-за дополнительных проблем, которые могут возникать на разных стадиях исследований. Так, в случае метода клоакальной инспекции ошибки могут возникать из-за того, что у самцов гусеобразных клоака выворачивается не всегда, и в этом случае они будут определены как самки (наши неопубликованные данные). Увеличить тщательность определения за счет приложения большей силы означает подвергнуть птицу опасности травмирования. Анализ ДНК, который в идеале должен давать практически 100%-й достоверный результат (Griffiths et al., 1998), на практике также иногда дает ошибки из-за плохих реактивов, путаницы при сборе образцов, необходимости «экстраполяции» биохимических сред и режимов анализов, разработанных для одних групп видов на другие и т.п.

Вместе с тем, недавние исследования показали, что пол у взрослых свистящих уток с очень высокой надежностью может быть определен по их характерным громким свистовым крикам. Было обнаружено, что по крайней мере для одного из видов свистящих уток – белолицей свистящей утки *Dendrocygna viduata* – различия в криках самцов и самок столь значительны, что легко обнаруживаются на слух после предварительного ознакомления с криками по звукозаписи. Если же использовать записи звуков, сделанные даже

на бытовую звукозаписывающую технику, и анализ звука с помощью бесплатных программ для звукового анализа, то для 100% надежного определения пола достаточно всего одного крика от особи (Володин и др., 2003). Это позволяет рекомендовать метод акустического определения пола для белолицей свистящей утки как в зоопарках, так и в природе (Volodin et al., 2003; Volodin et al., 2005). Кроме того, наши предварительные данные свидетельствуют о том, что столь же сильные различия в криках между полами существуют также еще у трех видов рода *Dendrocygna*: рыжей свистящей утки *D. bicolor*, кубинской свистящей утки *D. arborea* и осенней свистящей утки *D. autumnalis* (Volodina et al., 2004).

Однако, остается открытым вопрос о том, как заставить уток кричать именно в тот момент, когда исследователь хочет услышать их крики с целью определить пол птиц на слух или сделать запись для последующего анализа. Эта проблема оказывается наиболее серьезной именно для тех зоопарков, где содержится всего одна или нескольких особей какого-либо из видов свистящих уток. Такие малочисленные группы редко кричат спонтанно, к тому же их вокальная активность может сильно варьировать в зависимости от сезона года. Помимо этого, задача осложняется тем, что для анализа подходит только определенный тип крика – характерный громкий свист, который бывает двусложным или многосложным, в зависимости от вида уток (Johnsgard, 1971; Володин и др., 2003; Володина, Володин, 2003). Свисты этого типа довольно редко издаются, даже если группа сравнительно большая, но сидит в закрытом зимнем помещении, или если птицы уже сравнительно старые. В таких обстоятельствах дожидаться, пока птицы начнут кричать громкие свисты – это практически неразрешимая задача.

Именно такая ситуация сложилась при попытке сделать записи громких свистовых криков от группы из трех кубинских свистящих уток, содержащихся на экспозиции Московского зоопарка. Неоднократные попытки, предпринятые летом 2002-2003 гг., не дали никакого результата – ни одного громкого свиста записано не было, птицы изредка кричали только тихие трели. В этом исследовании мы попытались оценить, могут ли проигрывания записей видовых криков служить стимулами, надежно вызывающими ответные громкие свисты у кубинских свистящих уток, не проявляющих активного вокального поведения.

Методы

Группа из трех кубинских свистящих уток содержалась в совместной экспозиции с парой индийских журавлей *Grus antigona* в небольшой наружной вольере Московского зоопарка. Для индивидуальной идентификации свистящие утки были помечены цветными ножными кольцами.

Пол птиц был определен до начала настоящего исследования с помощью клоакальной инспекции в октябре 2002 г.; все птицы были определены как

самки. В мае 2005 г. пол птиц был переопределен методом PCR-амплификации ДНК (Griffiths et al., 1998) специфичными для половых хромосом праймерами P2 (5'-ТСТГСАТСТГАААТСТТТ-3') и P8 (5'-СТССААГГАТГАГРРААУТГ-3') на базе Кабинета методов молекулярной диагностики Института Проблем Экологии и Эволюции им. А.Н. Северцова РАН. По ДНК все три птицы были определены как самцы.

ДНК выделяли из пульпы перьев птиц (в основном, контурных) при помощи набора «DNA-DiatomPrep 200» (производитель «Лаборатория ИзоГен», Россия). PCR-амплификации была проведена в термоциклере ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (производитель «ДНК-технология», Россия) в общем объеме 20 мкл в оригинальных пробирках «МастерМикс» набора GenePak PCR Core (производитель «Лаборатория ИзоГен», Россия) по следующей программе:

1. Начальная денатурация при 94⁰С в течение 90 с;
2. 35 циклов: 94⁰ (30 с) - 50⁰ (60 с) - 72⁰ (90 с);
3. Завершение реакции – 72⁰ (6 мин.).

Разделение PCR-продуктов производили электрофорезом в 6% полиакриламидном геле в течение 80-90 минут при напряжении 130 Вольт. Гель окрашивали этидий-бромидом. Использование денатурирующего полиакриламидного геля вместо обычного агарозного было обусловлено необходимостью разделять гомологичные интроны двух половых генов, близкие по длине у видов рода *Dendrocygna*.

Образцы криков от самцов и самок кубинских свистящих уток, использованные для проведения сравнительного анализа, были отобраны нами из записей птиц известного пола, сделанных в открытой вольере Тиерпарка Берлина (Германия) в сентябре 2003 г. Из этих же записей была выбрана естественная последовательность громких свистовых криков группы кубинских свистящих уток длительностью 10 с для последующего проигрывания (рис. 1). Эта последовательность (как и звуковые последовательности еще от шести видов свистящих уток) вскоре будет доступна в «Галерее звуков животных» на интернет-сайте Московского зоопарка (<http://www.zoo.ru/moscow>).

Проигрывания и запись ответных криков кубинских свистящих уток были проведены в июле и сентябре 2004 г. Всего было проведено три серии проигрываний по 10 мин., каждая из которых включала по 3-4 последовательных трансляции тестовой звуковой последовательности. Звуки проигрывали с магнитофона Агидель-302С, установленного вплотную к решетке вольеры. Ответные крики уток записывали на магнитофон Sony-WM-D6С с динамическим микрофоном Sennheiser-845E. Два наблюдателя независимо друг от друга комментировали, какая из птиц издает крики. Поскольку три утки кричали одновременно, в процессе записи ответов каждый наблюдатель выбирал одну фокальную птицу и комментировал ее громкие свисты, затем при проведении других проигрываний фокальные птицы менялись, с тем, чтобы получить комментированные крики от всех птиц.

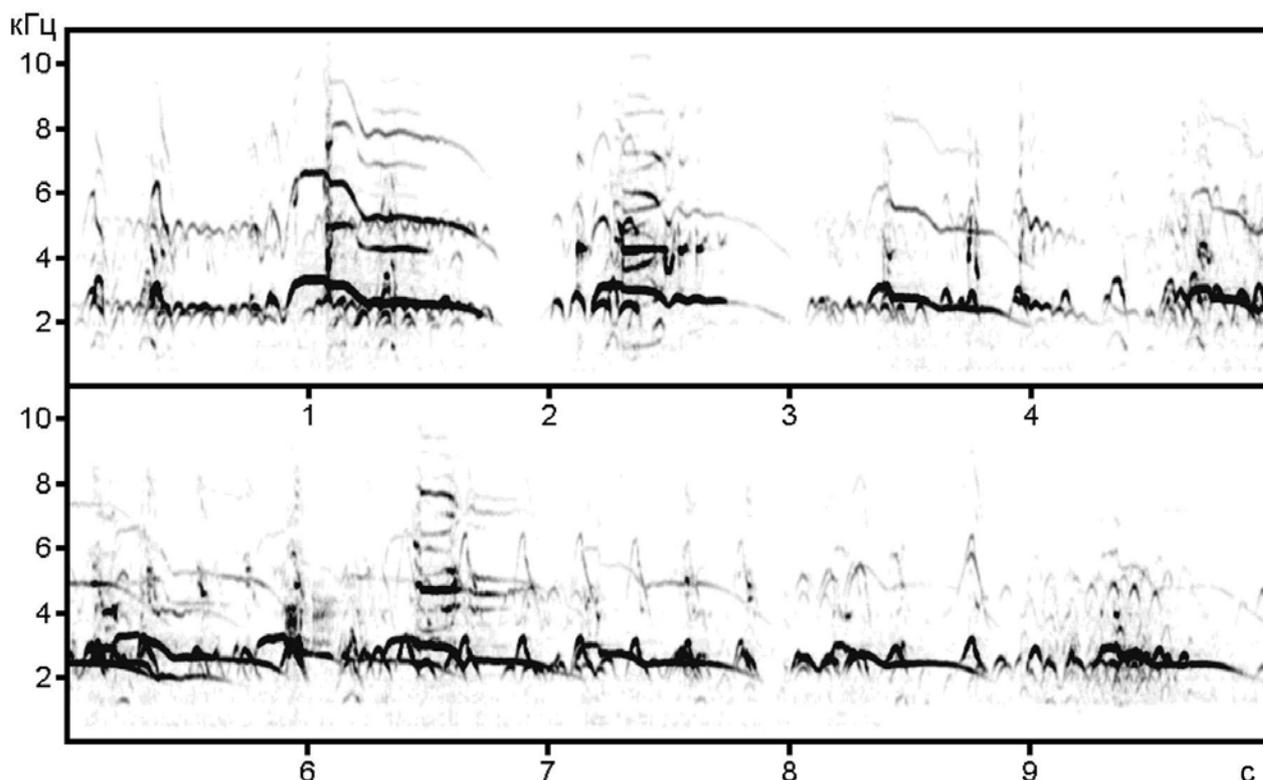


Рисунок 1. Спектрограмма звуковой последовательности криков группы кубинских свистящих уток, использованная для проигрывания.

Громкие свисты кубинских свистящих уток были оцифрованы с частотой дискретизации 22,05 кГц и проанализированы с помощью программы для анализа звуков Avisoft SASLab Pro (© R. Specht). Спектрограммы свистов были построены в окне Хэмминга, длина Быстрого Преобразования Фурье (FFT-length) 512 точек, перекрытие по частотной оси (frame) 50%, перекрытие по временной оси (overlap) 75%, и сравнены со спектрограммами криков самца и самки, построенными с использованием тех же параметров.

Результаты

Во всех случаях практически сразу после начала проигрывания у всех трех кубинских свистящих уток были отмечены сильные вокальные и двигательные реакции. Вокальный ответ громкими свистами начинался еще до завершения проигрывания 10 с звуковой последовательности. Все три птицы сразу начинали двигаться из глубины вольеры в сторону динамика и через 30-60 с после начала проигрывания располагались почти вплотную к нему с противоположной стороны решетки. Утки были явно возбуждены, но никакой агрессии по отношению друг к другу не проявляли. Во время нескольких проигрываний звуковой последовательности на протяжении 10 мин. серии наблюдений и от серии к серии у птиц не было заметно ни привыкания к стимулу, ни угасания ответных реакций.

Типичные крики самца и самки кубинских свистящих уток приведены на рисунке 2. Крики самцов выше по частоте, чем крики самок; максимальные основные частоты в криках самцов лежат выше 3 кГц, в то время как в криках

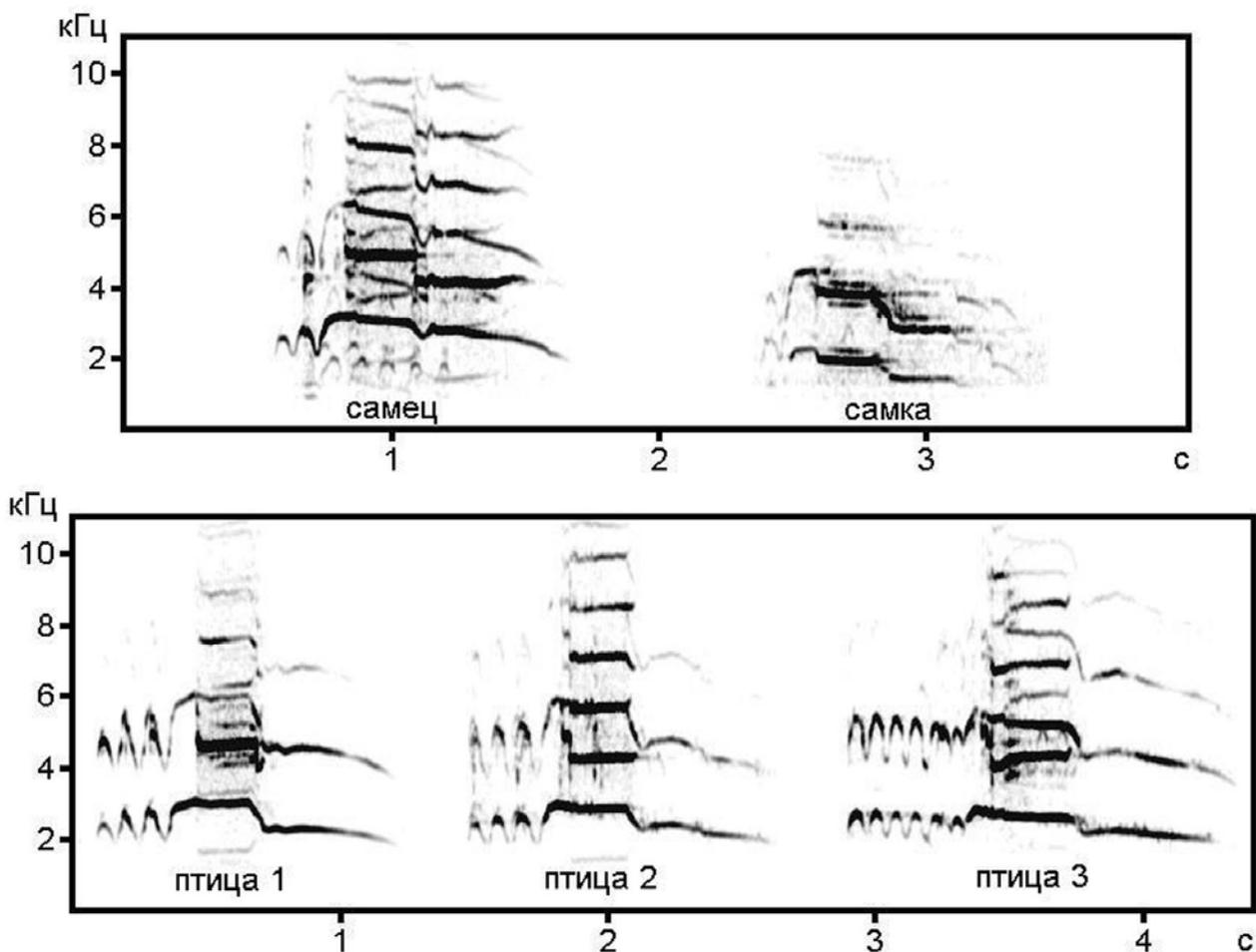


Рисунок 2. Вверху: Спектрограммы типичных громких свистовых криков самца (слева) и самки (справа) кубинских свистящих уток. Максимальная основная частота в крике самца лежит выше 3 кГц, а в крике самки – ниже 3 кГц. В крике самца также хорошо заметна вторая основная частота – яркая горизонтальная полоса в области 5 кГц, отсутствующая у самки. Внизу: Спектрограммы громких свистовых криков трех тестируемых кубинских свистящих уток. Видно, что все три образца крика соответствуют самцовому типу.

самок – ниже 3 кГц. Кроме этого, в криках самцов хорошо заметна вторая основная частота в области 5 кГц, то есть их крики являются бифоническими (Fee et al., 1998; Володин и др., 2005). Эти две особенности позволяют надежно отличать крики самцов и самок кубинских свистящих уток по спектрограммам.

Суммарно в трех 10 минутных записях был идентифицирован 151 громкий свист, из которых 89 (59%) принадлежали птице 1, 38 (25%) – птице 2, а 24 (16%) – птице 3. Все свисты от всех трех птиц по рисунку спектрограммы соответствовали самцовому типу (рис. 2). У всех трех птиц максимальная основная частота крика превышала 3 кГц, и в спектре звука наблюдалась бифония – вторая основная частота в области 4,5-5 кГц. Таким образом, на основании биоакустического определения пола было сделано заключение, что

все три особи являются самцами. Сделанный позднее генетический анализ подтвердил этот вывод – все три особи также оказались самцами.

Обсуждение

Таким образом, метод трансляции видоспецифических громких свистовых криков оказался очень эффективен для того, чтобы вызывать вокальные ответы у кубинских свистящих уток и легко и быстро позволил записать необходимое и достаточное для биоакустического анализа количество звуков для каждой из трех птиц. При этом качество предназначенных для трансляции звуков было достаточно высоким, но используемый магнитофон принадлежал к классу бытовой техники с весьма средними характеристиками. Однако, и этого оказалось достаточно для того, чтобы вызывать устойчивые и активные вокальные и двигательные ответы у кубинских уток.

Надо заметить, что величина группы была небольшой, что позволяло довольно легко определять, какая птица кричит. В стае птиц это было бы труднее, но именно для кубинских свистящих уток применение трансляции для стимуляции кричания в том числе и в больших группах представляется неизбежным. По нашему опыту наблюдений за свистящими утками разных видов в Тиерпарке Берлина, у таких видов, как осенняя свистящая утка, рыжая свистящая утка и белолицая свистящая утка, записать громкие свистовые крики от определенных особей без применения акустической стимуляции легче в больших группах, поскольку большое количество птиц лучше стимулирует активность друг друга, как двигательную, так и вокальную. Однако, записать спонтанные громкие свисты у кубинских свистящих уток даже в больших группах оказалось очень сложным, по крайней мере вне репродуктивного сезона. Относительная молчаливость этих птиц, по крайней мере, в отношении громких свистов, отмечалась и ранее (Johnsgard, 1965). При этом, если в больших группах спонтанные громкие свисты у кубинских свистящих уток относительно редки, то в малых группах и у одиночных птиц в неволе они вообще встречаются лишь как случайное событие. Таким образом, проигрывание криков представляется чрезвычайно ценным инструментом для того, чтобы стимулировать вокальную активность кубинских свистящих уток и использовать записи их криков для биоакустического определения пола.

Как правило, при трансляции звуков животным в условиях неволи обычно возникают две проблемы: адекватность ситуации и проигрываемых звуков естественным условиям и быстрое привыкание животных к проигрываемым стимулам. Эксперименты по трансляции звуков в природе обычно проводятся с большого расстояния, и при этом как бы моделируется ситуация приближения чужака к территории пары или стаи, к примеру, использование проигрываний звуков для вызова вокального ответа для определения пола и индивидуальной принадлежности у мраморного белонога *Podargus ocellatus* (Jones, Smith, 1997; Smith, Jones, 1997), для идентификации

гнездящихся пар серых журавлей *Grus grus* (Wessling, 2000), или для учета по голосам территориальных африканских неясытей *Strix woodfordii* (Delport et al, 2002). Напротив, в неволе животное очень быстро понимает, что звуки издает не другое животное, а динамик, поскольку за раздающимся вблизи звуком не следует ожидаемое появление конспецифика. Это приводит к резкому ослаблению или даже полному угасанию реакции всего после одного-двух повторений. К примеру, это было обнаружено у гепардов *Acinonyx jubatus* (Володина, 1994) и у американских журавлей *Grus americana* (Fitch, Kelly, 2000).

Отсутствие выраженного привыкания к ситуации проигрывания и к транслируемой записи у кубинских свистящих уток в неволе свидетельствует, что данная процедура хорошо подходит для этого вида и, вероятно, для других видов рода *Dendrocygna*. Акустическую стимуляцию можно неоднократно повторять до тех пор, пока от всех особей в группе не будут записаны крики с четко установленной индивидуальной принадлежностью. Таким образом, проигрывание видоспецифических криков позволяет в короткие сроки записать достаточно ответных криков от конкретных особей для последующего биоакустического определения пола у свистящих уток.

Благодарности

Мы искренне благодарны Н.А. Скуратову за помощь при проведении работы и предоставление материала для генетического анализа, О.А. Филатовой за оцифровку записей криков свистящих уток Тиерпарка Берлина, и А.В. Кленовой, принимавшей участие в сборе материала.

Список литературы

- Володин И.А., Володина Е.В., Кленова А.В., 2003. **Безошибочное определение пола по громким свистовым крикам у мономорфных белолицых свистящих уток *Dendrocygna viduata*** Научные исследования в зоологических парках, 16: 90-100.
- Володин И.А., Володина Е.В., Филатова О.А., 2005. **Структурные особенности, встречаемость и функциональное значение нелинейных феноменов в звуках наземных млекопитающих.** Журнал общей биол., 66 (4): 346-362.
- Володина Е.В., 1994. **Использование акустических методов при содержании и разведении гепардов (*Acinonyx jubatus*) в неволе.** Научные исследования в зоологических парках, 4: 92-100.
- Володина Е.В., Володин И.А., 2003. **Вокальный репертуар и индивидуальная изменчивость криков рыжей свистящей утки.** Казарка, Бюллетень Рабочей группы по гусеобразным северной Евразии, 9: 67-77.
- Delport W., Kemp A.C., Ferguson J.W.H., 2002. **Vocal identification of individual African Wood Owls *Strix woodfordii*: a technique to monitor long-term adult turnover and residency.** Ibis, 144: 30-39.

- Fee M.S., Shraiman B., Pesaran B., 1998. **The role of nonlinear dynamics of the syrinx in the vocalizations of a sonbird.** *Nature (Gr. Brit.)*, 395 (6697): 67-71.
- Fitch W.T., Kelly J.P., 2000. **Perception of vocal tract resonances by Whooping Cranes *Grus americana*.** *Ethology*, 106: 559-574.
- Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R., 1998. **A DNA test to sex most birds.** *Molec. Ecology*, 7: 1071-1075.
- Johnsgard P.A. 1965. **Handbook of Waterfowl Behaviour.** Constable & Co., Ltd., London.
- Johnsgard P.A. 1971. **Observations on sound production in the Anatidae.** *Wildfowl*, 22: 46-59.
- Jones D.N., Smith G.C., 1997. **Vocalisations of the marbled frogmouth II: An assessment of vocal individuality as a potential census technique.** *Emu*, 97 (4): 296-304.
- Petrie S.A., Rogers K.H. 1997. **Ecology, Nutrient Reserve Dynamics and Movements of White-faced Ducks in South Africa.** Department of Environmental Affairs and Tourism, Pretoria.
- Smith G.C., Jones D.N., 1997. **Vocalisations of the marbled frogmouth I: Descriptions and an analysis of sex differences.** *Emu*, 97 (4): 290-295.
- Volodin I.A., Volodina E.V., Klenova A.V., 2003. **Non-invasive sex recognition in the white-faced whistling duck.** *Int. Zoo News*, 50 (3): 160-167.
- Volodin I.A., Volodina E.V., Klenova A.V., Filatova O.A., 2005. **Individual and sexual differences in the calls of the monomorphic white-faced whistling duck *Dendrocygna viduata*.** *Acta Ornithologica*, 40 (1): 43-52.
- Volodina E., Volodin I., Klenova A., Khudjakova T., Matrosova V., Filatova O., 2004. **Bioacoustical sexing and individual identification provide alternatives to capture both in zoos and in the wild.** *Advances in Ethology*, 38: 90.
- Wessling B., 2000. **Individual recognition of cranes, monitoring and vocal communication analysis by sonography.** Proceedings of the IV. European Crane Workshop. Verdun.

Summary

*Volodin I.A., Volodina E.V., Matrosova V.A., Kholodova M.V. Bioacoustical sexing with playback-evoked loud whistles in the Cuban whistling duck *Dendrocygna arborea*.* In the Cuban whistling duck, similarly with other *Dendrocygna* species with lack of sexual differences, sex may be easily determined with a single loud whistle per individual. However, spontaneous production of this call type is unpredictable in this species. Playbacks of species-specific call sequence allowed to record 89, 38 and 24 loud whistles from three Cuban whistling ducks of unknown sex respectively, as soon as during three 10-minutes playback-recording sessions. These calls were compared with typical male and female call patterns for this species. Also, DNA-based analysis (PCR-amplification of DNA) was made. Both bioacoustical and DNA sexing determined these ducks as males. Playback technique may be recommended as high-effective method to provoke vocalisations in whistling ducks for further bioacoustical sexing.