

Selected aspects of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) reproduction

Różniewska N., Barszcz K., Department of Morphological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to present some important aspects on the giant panda reproduction. Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) as a critically endangered species is also a well recognized symbol of wildlife protection and conservation. There are only 2000 giant pandas in the world and almost 300 live in captivity in zoos worldwide. The rest of these animals live in Chinese breeding centers. Despite huge contribution to their protection, it is still a problem to enlarge and stabilize population of giant pandas. The objective of this review was to present chosen problems of these animals reproduction. The article is based on the authors' own experience after one month veterinary internship at Bifengxia Panda Base and Research Center in China.

Keywords: giant panda, reproduction.

Panda wielka (*Ailuropoda melanoleuca*), jako gatunek krytycznie zagrożony wyginięciem, jest międzynarodowym symbolem ochrony środowiska. Na świecie żyje około 2000 osobników, z czego około 300 to zwierzęta zamieszkujące ogrody zoologiczne na całym świecie oraz ośrodki naukowe w Chinach. Według chińskiego prawa za zabicie dzikiej pandy grozi kara śmierci. Obecnie główną przyczyną spadku liczebności tych zwierząt jest ekspansja miast i wycinka lasów bambusowych.

W chińskiej prowincji Syczuan, gdzie zwierzęta te występują na wolności, powstał specjalistyczny ośrodek hodowli pand – Bifengxia Panda Base. Głównym jego celem jest stworzenie stabilnej populacji na wolności.

Programy hodowlane odgrywają ważną rolę w badaniach nad zachowaniem zagrożonych gatunków. Jednym z wielu wyzwań jest ustanowienie szczegółowego protokołu krycia symulującego rozród, niczym w środowisku naturalnym. W przypadku zwierząt rozmnażanych w hodowli *ex situ*, według programu do zachowania gatunków zagrożonych wyginięciem, najistotniejszą rolę odgrywa zapewnienie maksymalnej różnorodności genetycznej, umożliwiającej zachowanie integralności gatunku i zdolności reprodukcyjnej.

W Bifengxia przebywa już piąte pokolenie pand, a tymczasem próby wypuszczenia ich na wolność dotąd się nie powiodły. Obecnie prowadzony jest eksperymentalny trening młodych osobników,

Wybrane zagadnienia z rozrodu pandy wielkiej (*Ailuropoda melanoleuca*)

Natalia Różniewska*, Karolina Barszcz

z Katedry Nauk Morfologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

mający na celu nauczenie ich samodzielniego przetrwania w naturalnych warunkach rezerwatów Syczuanu.

Charakterystyka rozrodu

Rozród pandy wielkiej od lat napotyka trudności. Niestety, z powodu małej liczby przedstawicieli tego gatunku w niewoli, wciąż bardzo niewiele wiemy na temat tych zwierząt, co dodatkowo utrudnia sterowanie rozrodem. Ponieważ większość pand na świecie należy do Chin, wiąże się to z dodatkowymi restrykcjami i utrudnieniami dla wszelkich ośrodków badawczych poza terytorium Państwa Środka. Ponadto mała populacja oznacza niewielką pulę genetyczną, która jest dodatkowym czynnikiem ograniczającym. Należy także zaznaczyć, że najcenniejszy jest materiał genetyczny dzikich osobników.

Według danych literaturowych 29% całej populacji pand utrzymywanych w niewoli pochodzi od zaledwie czterech osobników (1). W Bifengxia każdej samicy przypisane są samce w kolejności od najbardziej pożądanym genetycznie. Niestety, osobniki wybrane przez pracowników rzadko są sobą zainteresowane, co uniemożliwia naturalne krycie.

Przeprowadzone badania dowiodły, że u 30% samców utrzymywanych w niewoli zaobserwowano całkowity zanik popędu płciowego (2). Nie wykazują one zainteresowania samicami w rui, ani typowych zachowań płciowych w sezonie rozrodczym. Spośród nich należy wymienić: znaczenie terenu moczem w tzw. pozycji do góry nogami, obwąchiwanie i nasilenie wokalizacji. W większości ogrodów zoologicznych utrzymywana jest tylko jedna para tych zwierząt. Stąd też narodziny pandy są zawsze wydarzeniem na światową skalę.

Kolejnym czynnikiem utrudniającym hodowlę pand jest fakt, iż są to zwierzęta sezonowo monoestralne. Ruja trwa średnio 24–72 godziny i przypada w okresie od lutego do maja. Niewykrycie w porę owulacji sprawia, że samica zostaje wykluczona z sezonu rozrodczego w danym roku. Długość ciąży rozpięta jest w szerokim zakresie 85–160 dni w wyniku zjawiska zwanego opóźnioną implantacją. Zarodek implantuje się

w ścianie macicy po 1,5–4 miesiącach. Po zapłodnieniu rozwój embrionalny jest zatrzymany w stadium blastocysty na dłuższy czas, a gdy nastaną sprzyjające warunki (m.in. temperatura związana z porą roku, obfitość pożywienia) następuje rozwój płodu. Porody przypadają zwykle od lipca do września. Samica rodzi od 1 do 3 młodych. Według danych literaturowych cięższe bliźniaczki stanowią 48%, a trojaczki 2% wszystkich ciężych (2). Samica zawsze wybiera najsilniejszego osobnika i porzuca pozostałe młode. Zjawisko to nie jest do końca wyjaśnione. Uważa się, że jest ono spowodowane trudnościami w wykarmieniu i odchowaniu potomstwa. W Bifengxia naukowcom udaje się odchować każde z bliźniąt. Co kilka godzin, a następnie co kilka dni podmienia się młode tak, aby tylko jedno z nich przeżywało z matką. W tym czasie drugi osobnik jest pod opieką specjalistów. Dzięki temu młode dostają unikatowe w składzie mleko matki oraz mleko zastępcze.

U pand wielkich opisano występowanie ciąży urojonej, podczas której zwierzęta wykazują zmiany behawioralne, fizjologiczne i hormonalne identyczne jak podczas rzeczywistej ciąży, co stanowi dodatkowe utrudnienie diagnostyczne.

W Bifengxia Panda Base opracowano system, który polega na codziennej obserwacji zachowań zarówno samic, jak i samców od początku sezonu rozrodczego. Wraz z pierwszymi objawami proestrus rozpoczynają się badania moczu na obecność estrogenu. Jego zwiększony poziom jest sygnałem oznaczającym zbliżającą się owulację. Wówczas samica jest prezentowana kolejnym samcom z listy aż do momentu kopulacji. W przypadku niepłodzenia stosuje się sztuczną inseminację świeżym nasieniem pobranym metodą elektro ejakulacji od wybranego samca. W innych ośrodkach badawczych samice inseminuje się, mimo udanej kopulacji, w celu zwiększenia szansy na zapłodnienie.

Zachowania płciowe

Samice osiągają dojrzałość płciową w wieku ok. 3 lat, samce w wieku ok. 5 lat. Do rozrodu wykorzystuje się osobniki, które

* Studentka VI roku Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

osiągnęły dojrzałość hodowlaną, czyli są w wieku 6–7 lat (2).

W Bifengxia Panda Base sąsiadujące ze sobą klatki mają zakratowane okna, przez które pandy mogą się obserwować i obwąchiwać, co zdecydowanie sprzyja stymulacji zarówno samic, jak i samców (ryc. 1). Zwierzęta rozmieszczone są tak, aby każda samica miała kontakt z dwoma samcami. Obserwacja zachowań pand przed dopuszczeniem ich do krycia pozwala w pewnym stopniu przewidzieć, czy dane osobniki będą wobec siebie agresywne.

Najczęściej na 7–14 dni przed spodziewaną owulacją obserwuje się zmiany zachowania samic. Spośród typowych objawów należy wymienić: zwiększoną aktywność ruchową (m.in. zwijanie się w kłębek, toczenie po ziemi, wymachiwanie kończynami, robienie fikołków), zmniejszenie przyjmowania pożywienia oraz znaczenie terenu (ryc. 2). Zwiększa się także wokalizacja, przy czym wydawane przez nie odgłosy różnią się istotnie w zależności od gotowości do kopulacji. W tygodniu poprzedzającym owulację objawy nasilają się, zmianie ulega także wokalizacja samic. Dźwięki przypominające ćwierkanie świadczą o gotowości do kopulacji. Natomiast warczenie i szczekanie mają na celu odstraszenie samców. Ponadto charakterystyczne jest chodzenie do tyłu i pocieranie okolicy zewnętrznych narządów płciowych o ściany lub podłogę (ryc. 2). Zwiększa się aktywność samic w tej części klatki, w której mają kontakt wzrokowy i węchowy z samcem, którym są zainteresowane. Najbardziej typowym objawem świadczącym o zbliżającej się owulacji, występującym tylko przy gwałtownym wzroście poziomu estrogenu, jest tzw. tail-up lordosis, czyli unoszenie ogona i wygięcie grzbietu eksponujące zewnętrzne narządy płciowe. W celu sprawdzenia objawu tolerancji, pociera się okolicę ogona samicy (3; ryc. 3).

Określanie czasu owulacji

Zabiegi diagnostyczne, jak pobranie krwi, badanie ultrasonograficzne przez powłoki brzuszne, a także waginoscopia są możliwe bez uspokojenia farmakologicznego wyłącznie przez kratki w klatce u spokojnych i wytresowanych osobników.

Standardowym badaniem do wykrycia owulacji jest oznaczanie poziomu estrogenów w moczu samic, które wykazują pierwsze zmiany zachowania świadczące o zbliżającej się rui. Szczyt koncentracji estrogenu w moczu potwierdza gotowość samicy do kopulacji. Do badania wykorzystuje się 1–2 ml porannego moczu pobieranego z podłogi klatki. Następnie próbka przechowywana jest w temperaturze -20°C w oznakowanej, plastikowej fiolce. Mocz bada się na obecność 3-glukuronidu



Ryc. 1. Stymulacja wzrokowa i węchowa (fot. N. Roźniewska)



Ryc. 2. Zachowania płciowe (fot. N. Roźniewska)

estronu przy użyciu testu immunoenzymatycznego stałej fazy (ELISA). Dodatkowo kontroluje się różnicę stężeń między poszczególnymi próbkami moczu samic, oznaczając stężenie kreatyniny, która

jest pośrednim wskaźnikiem codziennego bilansu płynów. Dzięki temu przelicza się koncentrację hormonów oraz kreatyniny na mililitr moczu, otrzymując wiarygodny wynik zapisany w nanogramach estrogenu na



Ryc. 3. Sprawdzenie objawu tolerancji: A - samica niegotowa do krycia, B - samica gotowa do krycia - tail-up lordosis (fot. N. Roźniewska)

miligram kreatyniny. Próbkę moczu z koncentracją kreatyniny $<0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ uznawane są za zbyt rozcieńczone. Na uwagę zasługuje fakt, że kryterium to eliminuje około 7% próbek (1).

Koncentracja estrogenu w moczu i kale stopniowo wzrasta na około 5–10 dni przed przedowulacyjnym jego pikiem związanym z aktywnością pęcherzyków jajnikowych. Hormon ten szybko jest metabolizowany i wraca do wartości wyjściowej w ciągu 7 dni. Wydalanie estrogenów z moczem zachodzi szybciej niż z kałem, dlatego też zmiany ich stężeń mogą być wcześniej wykryte poprzez badanie moczu (4, 5).

Tak jak już wspomniano, badanie moczu jest powszechnie stosowane u pand trzymanych w niewoli. W przypadku osobników dziko żyjących wykorzystuje się badanie kału. Na uwagę zasługuje fakt, że odchody tych zwierząt charakteryzują się różną zawartością włókien. Stąd też próbki do badania powinny być pobierane

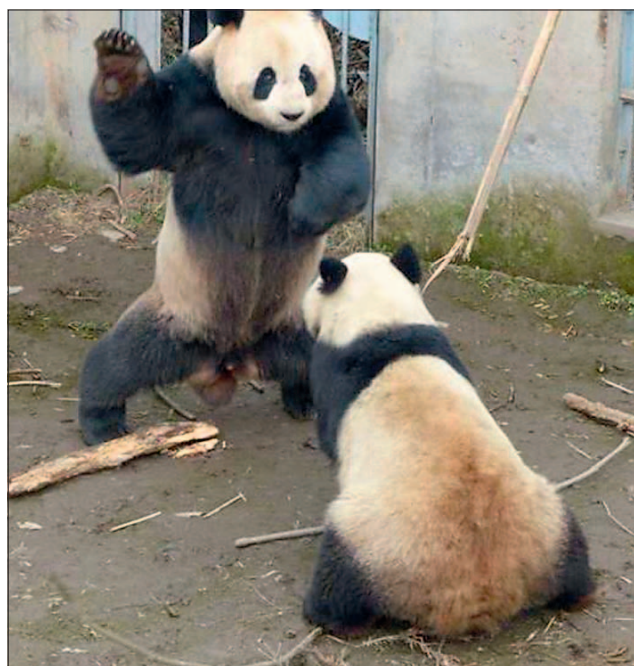
z mas kałowych zawierających większą ilość strawionego bambusa. Przechowuje się je w plastikowych oznakowanych torbach w temperaturze -20°C aż do przetworzenia. W kolejnym etapie są one suszone w liofilizatorze i kruszone w celu oddzielenia sproszkowanego kału od niestrawionych resztek pokarmu. Sproszkowany kał przechowuje się w temperaturze -20°C w znakowanych, plastikowych rurkach. Po rozmrożeniu pobiera się 0,1 g próbki kału i poddaje ekstrakcji w 90% etanolu w celu przeprowadzenia analizy hormonalnych metabolitów. Następnie ekstrakty suszy się na powietrzu i zawiesza w 1 ml buforu fosforanowego bez dodatku albuminy bydlęcej (1).

Faza lutealna cyklu samic pandy wielkiej jest najmniej poznanym jak dotąd etapem. Charakteryzuje się dwukrotnym wzrostem koncentracji progesteronu po owulacji. Pierwszy z nich następuje około 20 dni po pikie estrogenu, co potwierdza owulację

i wskazuje na formowanie się ciała żółtego. Progesteron osiąga dwukrotnie wyższą wartość w stosunku do wartości progowej, która utrzymuje się przez 74–122 dni. Drugi skok do wartości ośmiokrotnie wyższej trwa średnio 40–50 dni. Pierwszy skok jest z reguły wyższy u samic ciężarnych, drugi przyjmuje podobne wartości zarówno u ciężarnych, jak i nieciężarnych. Nie stwierdzono różnic w utrzymywaniu się podwyższonego stężenia progesteronu u ciężarnych i nieciężarnych samic. Badania przeprowadzone na norkach, borsukach i skunksach dowiodły, że drugi skok progesteronu związany jest z implantacją zarodka. Uważa się, że u pandy wielkiej zachodzi podobny mechanizm (2).

Zapłodnienie naturalne

Objaw tolerancji oraz tzw. tail-up lordosis występuje zawsze w połączeniu ze wzrostem koncentracji estrogenu w moczu.



Ryc. 4. Krycie naturalne (fot. N. Roźniewska)

Ryc. 5. Zachowania agresywne samca (fot. N. Roźniewska)

Jest to jedyny możliwy okres do zapłodnienia drogą krycia naturalnego (ryc. 4). W ośrodku Bifengxia Panda Base samice poddawane są naturalnemu kryciu z kilkoma samcami w 2–3-dniowym okresie rui. Jak już wspomniano, zestawianie osobników jest wyjątkowo trudne. Nie poznano do końca, na jakiej podstawie pandy dobierają się w pary, gdyż informacje dotyczące rozrodu tych zwierząt są niepełne. W środowisku naturalnym samce walczą ze sobą o prawo do kopulacji. Niestety, w niewoli ich agresja często przekierowana jest na samice (ryc. 5). Według przeprowadzonych obserwacji wynika, że to właśnie agresywne samce najczęściej mają szansę na zdobycie samicy. W ośrodkach badawczych pracownicy nie dopuszczają do krycia takich osobników.

Wybór samców hodowlanych powstaje w oparciu o:

- coroczne rekomendacje przedkładane przez Conservation Breeding Specialist Group of the International Union for Conservation of Nature, ze wskazaniem opracowanych na podstawie modelowania komputerowego kombinacji samiec-samica zachowujących najwyższy poziom zróżnicowania genetycznego;
- zdolność do pomyślnego obcowania z samicą na podstawie doświadczeń z lat ubiegłych;
- powinowactwo i otwartość zachowania samicy docelowej, utrzymywanej w sąsiednim boksie.

Agresywne lub nieskuteczne w kryciu samce o dużej wartości hodowlanej wykorzystywane są do sztucznej inseminacji.

Pobieranie nasienia

W celu pobrania nasienia najbardziej pożądanym genetycznie samiec jest znieczulany ketaminą podawaną domięśniowo w dawce 6–8 mg/kg m.c. i w razie potrzeby podtrzymywany na izofluranie (0,3–0,5 mg/kg m.c.). Do stymulacji ejakulacji używa się sondy rektalnej z trzema elektrodami i ejakulatora o częstotliwości fali 60 Hz. Przeprowadza się 20–30 stymulacji prądem o niskim napięciu (2–8 V). Uzyskane nasienie poddawane jest ocenie mikroskopowej w celu określenia ruchliwości, żywotności, morfologii i liczebności plemników. Do inseminacji wykorzystuje się świeże nasienie o następujących parametrach: ruchliwość plemników >80%, ocena ruchu ≥ 3 (skala 0–5), koncentracja minimum 100×10^6 plemników/ml.

Inseminacja

W większości ośrodków badawczych zabieg inseminacji przeprowadza się wyłącznie w nocy po dniu, w którym wyznaczono pik estrogenu. Zwiększa to bezpieczeństwo znieczulenia, gdyż pandy przez cały dzień pobierają pokarm.

Znieczulenie do zabiegu przebiega tak samo jak w przypadku elektroejakulacji samców. Do inseminacji wykorzystuje się kateter (zewnętrzna średnica 25,5 mm, długość 125 mm) z mandrynem (średnica zewnętrzna 3,5 mm, średnica wewnętrzna 1 mm, długość 300 mm) ze stali nierdzewnej. Wprowadza się go na głębokość ok. 18 cm. Strzykawka jest wykorzystana do przeniesienia świeżego lub rozmrożonego nasienia z łaźni wodnej do kateteru.

Nasienie (1–2 ml) jest deponowane do macicy pandy leżącej w pozycji grzbietowej. Bezpośrednio po zabiegu kończyny miedniczne samicy należy przytrzymać pod odpowiednim kątem 45° przez kilka minut, aby ograniczyć wpływ nasienia (1, 6, 7, 8).

Piśmiennictwo

1. Huang Y., Zhang H., Li D., Zhang G., Wei R., Huang Z., Zhou Y., Zhou Q., Liu Y., Wildt E. D., Hull V.: Relationship of the estrogen surge and multiple mates to cub paternity in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): implications for optimal timing of copulation or artificial insemination. *Biol. Reprod.* 2012, **87**, 1-7.
2. Kersey D. C.: *Reproductive and Adrenal Endocrinology of the Giant Panda (Ailuropoda melanoleuca)*. George Mason University Fairfax, VA 2008.
3. Lindburg D. Baragona K.: Reproduction in giant pandas: hormones and behaviour. W: *Giant Pandas Biology and Conservation*. University of California Press, London 2004, s. 125-131.
4. Steinman K.J., Monfort S.L., McGeehan L., Kersey D.C., Gual-Sil F., Snyder R.J., Wang P., Nakao T., Czekala N.M., Wildt D.E., Zhang A., Zhang H., Janssen D.L., Ellis S.: Endocrinology of the giant panda and application of hormone technology to species management. W: *Giant Pandas: Biology, Veterinary Medicine and Management*. UK: Cambridge University Press, Cambridge, 2006, s. 198–230.
5. Kersey D. C., Wildt D. E., Brown J. L., Snyder J. R., Huang Y., Monfort S. L.: Endocrine milieu of perioestrus in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), as determined by non-invasive hormone measures. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010, **22**, 901-912.
6. Hori T., Hashizaki F., Narushima E., Komiya T., Orima H., Tsutsui T.: A Trial of Intrauterine Insemination Using a Fiberscope in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J. Vet. Med. Sci.* 2006, **68**, 987-990.
7. Huan Y., Li D., Zhou Y., Zhou Q., Li R., Wang C., Huang Z., Hull V., Zhang H.: Factors affecting the outcome of artificial insemination using cryopreserved spermatozoa in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology* 2012, **31**, 561-573.
8. Spindler R. E., Huang Y., Howard J.G., Zhang H., Zhang G., Wildt D.E.: Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) spermatozoon decondensation in vitro is not compromised by cryopreservation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2006, **18**, 767-775.