

This article can be used for crane species identification. The analyses of sex and age structure in crane flocks can be implemented if more materials are collected during the occasional discovery of dead cranes after natural disaster or during occasion cases.

Key words: Siberian Crane, Common Crane, Demoiselle Crane, humeral bone, morphological and morphometric characteristics

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И МУЛЬТИЛОКУСНОЕ ГЕНОТИПИРОВАНИЕ СТЕРХА ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Е.А. Мудрик¹, Т.А. Кашенцева², Д.В. Политов¹

¹*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН*

E-mail: mudrik_len@mail.ru

²*Питомник редких видов журавлей*

Окского государственного природного биосферного заповедника

E-mail: tk.ocbc@mail.ru

Введение

Изучение внутривидового генетического разнообразия имеет ключевое значение для сохранения природных популяций редких видов, а также для охраны и воспроизводства их генотипов в искусственных популяциях. Такие популяции предоставляют уникальную возможность для анализа генетической изменчивости редких видов журавлей, сбор образцов биологического материала которых в природе сопряжен с огромными трудностями как технического, так и правового характера. В то же время искусственные популяции, созданные на ограниченном генетическом материале, подвержены угрозе близкородственных скрещиваний, нарастанию инбридинга и, как следствие, снижению адаптивных возможностей особей. Для предотвращения этих явлений, а также с целью сохранения исходного генетического разнообразия и успешной реинтродукции в природу, в мировой практике генетического контроля при разведении редких видов в искусственно созданных условиях эффективно используют молекулярные маркеры (Lacy, 1994; Ivy, Lacy, 2010). Наиболее соответствующими данному спектру задач генетическими маркерами являются высокоизменчивые микросателлитные локусы (Tautz, 1989). Кроме возможности оценки популяционно-генетических параметров, анализ 8 – 10 полиаллельных микросателлитных локусов позволяет составить уникальный генетический портрет каждой особи. Именно поэтому микросателлиты незаменимы для генетической паспортизации, установления отцовства при искусственном осеменении, идентификации особей с неизвестным происхождением, а также реконструкции генетических родословных, что особенно актуально для искусственных популяций редких видов. В отношении журавлей подобные работы с применением микросателлитов наиболее детально проведены для американского журавля, *Grus americana* (Jones, Nicolich, 2001; Jones et al., 2002, Jones et al. 2010). Специфические наборы микросателлитных локусов также разработаны для таких редких видов, как японский журавль, *G. japonensis* (Hasegawa et al., 2000; Zou et al., 2010) и райская красавка, *Anthropoides paradisea* (Meares et al., 2008). В отношении эндемика России стерха, *G. leucogeranus*, имеющего статус уязвимого вида и

занимающего третье место по малочисленности после американского и японского журавлей (Meine, Archibald, 1996), микросателлитный анализ никогда ранее не проводили.

Цель данной работы – тестирование и анализ изменчивости микросателлитных локусов для оценки генетического разнообразия и мультилокусного генотипирования стерха на примере птиц из популяции, содержащейся в искусственно созданных условиях.

Материалы и методы

В исследование включены особи стерха, содержащиеся в Питомнике редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника, а также выращенные в Питомнике и выпущенные в природу птенцы и птицы, переданные в зоопарки Таллина и Калининграда. Общая выборка изученных птиц составила 49 особей. Материалом для выделения ДНК в разных случаях служили образцы крови, собранные в ходе ежегодной плановой диспансеризации журавлей, кровеносные сосуды аллантаоиса из подскорлуповых оболочек яиц после вылупления птенцов и некрупные (до 10 см) перья птиц. Выделение ДНК проводили с помощью ионообменной смолы Chelex 100 (Walsh et al., 1991) с некоторыми модификациями. Для тестирования микросателлитной изменчивости стерха использовали 16 полиморфных локусов, изолированных из геномов американского журавля: *Gram-22*, *Gram-25*, *Gram-30*, *Gram-42* (Jones et al., 2010), райской красавки: *Gpa-12*, *Gpa-32*, *Gpa-35*, *Gpa-36*, *Gpa-38*, *Gpa-39* (Meares et al., 2008) и японского журавля: *Gj-M8*, *Gj-M11a*, *Gj-M13*, *Gj-M15*, *Gj-M34*, *Gj-M48b* (Hasegawa et al., 2000). Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 6% полиакриламидном геле в трис-ЭДТА-боратной буферной системе, окрашивание гелей – раствором бромистого этидия с последующей визуализацией в УФ-свете. Расчет параметров генетического разнообразия производили в надстройке для электронной таблицы MS Excel – GenAlEx 6.41 (Peakall, Smouse, 2006).

Результаты и обсуждение

Все 16 микросателлитных локусов успешно амплифицировались у стерха, однако восемь локусов были исключены из дальнейшего анализа по следующим причинам: из-за мономорфности (локусы *Gram-42*, *Gpa-35*, *Gj-M11a*), недостаточной информативности (по два аллеля на локус у *Gj-M8* и *Gj-M13*), из-за слабой воспроизводимости и вероятного присутствия «нуль»-аллелей (*Gj-M48b*), а также методической непригодности для генотипирования в используемых нами условиях (*Gram-25*, *Gpa-36*). Остальные восемь локусов характеризовались воспроизводимостью и четкостью интерпретации, и поэтому были отобраны нами для мультилокусного генотипирования и оценки генетической изменчивости стерха (табл. 1).

Число аллелей, идентифицированных по каждому из этих локусов, варьировало от 3 до 9, и в среднем составило $5,6 \pm 0,7$ аллелей на локус. Значения уровней наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности находились в пределах 0,57 – 0,83 (в среднем $0,76 \pm 0,04$) и 0,52 – 0,78 (в среднем $0,67 \pm 0,03$), соответственно. Такие высокие значения гетерозиготности свойственны микросателлитным локусам из-за множественности аллельных вариантов, обусловленных изменчивостью числа повторяющихся мотивов ДНК. Все локусы характеризовались равновесным распределением генотипов согласно закону Харди-Вайнберга, что свидетельствует об отсутствии скрытых «нуль»-аллелей, которые часто могут быть проблемой при анализе локусов, изначально разработанных для анализа других родственных видов.

Уровни генетической изменчивости, обнаруженные у стерха, в разной степени сопоставимы с данными по ортологичным локусам у других видов журавлей, для которых они были впервые охарактеризованы или протестированы. Так, уровень полиморфизма анализированных нами локусов набора *Gram* у стерха был выше по числу аллелей на локус и значениям

Таблица 1. Характеристика микросателлитных локусов и параметры генетической изменчивости стерха
Table 1. Characteristics of microsatellite loci and genetic variation parameters for the Siberian Crane

Локус Locus	Последовательность праймера (5' – 3') Primer sequence (5' – 3')	Мотив Motif	Размер фраг- мента, п.н. Fragment size (bp)	A	H_o	H_E
<i>Gram-30</i>	F: CAGTCGGGGCGTCATCATGTAAAGCTCCTTGGGCTG R: ATGAAGGGTGACAACGTAAAC	(AAGG) ₇	178 – 210	8	0,83	0,78
<i>Gram-22</i>	F: CAGTCGGGGCGTCATCACCATTGGCACAATCCCTC R: AACCTATTTGCTGTTTCCTATTACTC	(AAAC) ₉	160 – 172	4	0,80	0,61
<i>Gpa-12</i>	F: GATCAATGCGAAGGATAGGGAGGT R: TCATCAATCTATTATTTGCCTCAGC	(GATA) ₁₁	202 – 218	5	0,69	0,64
<i>Gpa-38</i>	F: GGGCAGAAGCAAGTCTTTCA R: GAAGATGTTTGCTGGTTGCAC	(STAT) ₁₃	170 – 190	6	0,74	0,66
<i>Gpa-32</i>	F: CCCAGCACACCGTGCATAAG R: GCAGTCGGTCACATCCTTGG	(GT) ₁₁	174 – 180	3	0,57	0,52
<i>Gpa-39</i>	F: TGCACAGTTTGGCCAAGAAG R: TTCCAAAAGTGAATTTAAAGGTGTGTGG	(GA) ₂ (GATA) ₁₃	86 – 120	9	0,90	0,79
<i>Gj-M15</i>	F: TCTACCAGATATCATCAGAGCTTGC R: TGCGAATGAACAGATGGCCCAAGA	(CA) ₁₃	100 – 112	6	0,75	0,65
<i>Gj-M34</i>	F: TGCTCAACATTCATCAGGATTTGGG R: TCCCTCTGGTGTGGCTGAAAATAC	(AC) ₁₉	138 – 146	4	0,82	0,71
<i>Среднее/ Mean</i>				5,6 ± 0,7	0,76 ± 0,04	0,67 ± 0,03

Примечание: A – число аллелей на локус, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_E – ожидаемая гетерозиготность, п.н. – пар нуклеотидов

Notes: A – number of alleles per locus, H_o – observed heterozygosity, H_E – expected heterozygosity, bp – base pairs.

гетерозиготности по сравнению с американским, и сопоставим с данными по канадскому журавлю (Jones et al., 2010). Изменчивость локусов серии *Gpa* у стерха была на уровне, установленном для райской красавки, восточного венценосного и сережчатого журавлей (Meares et al., 2008). Полиморфизм локусов *Gj-M* у стерха был на уровне генетической изменчивости материковой популяции японского журавля и выше, чем у особей островной популяции этого вида (Hasegawa et al., 2000).

Установленные диплоидные генотипы всех анализируемых птиц по восьми локусам были записаны в виде пар аллелей, обозначенных в соответствии с их молекулярным весом (табл. 2). При сведении в таблицу мультилокусных генотипов, полученные данные позволяют определять родственные отношения птиц, в том числе устанавливать их происхождение и отцовство. В табл. 2 показаны примеры, где при известных матерях и двух возможных отцах у потомства, полученного в результате искусственного осеменения, определен истинный отец, а также пример идентификации особи с неизвестным происхождением. Так,

Таблица 2. Фрагмент таблицы мультилокусных генотипов стерха по 8 микросателлитным локусам с примерами установления отцовства и идентификации птиц с неизвестным происхождением
Table 2. Fragment of the table of multi-locus Siberian Crane genotypes by 8 microsatellite loci with examples of paternity analysis and identification of individual with unknown origin

№	№ МПК ISCS No	Пол Sex	Происхождение Origin	Микросателлитные локусы Microsatellite loci							
				<i>Gram-30</i>	<i>Gram-22</i>	<i>Gra-12</i>	<i>Gra-38</i>	<i>Gra-32</i>	<i>Gra-39</i>	<i>Gj-M15</i>	<i>Gj-M34</i>
1	еще нет absent	♂	мать 219, отец 15 или 646 mother 219, father 15 or 646	186 198	160 172	210 214	170 178	174 174	86 102	104 104	138 146
	219	♀	из природы, Зап. Сибирь wild, Western Siberia	198 198	160 172	214 214	170 186	174 176	102 106	104 104	138 146
	15	♂	из природы, Вост. Сибирь wild, Eastern Siberia	182 194	160 164	202 218	178 190	174 174	102 102	104 108	138 146
	646	♂	мать 128, отец 82 mother 128, father 82	186 194	160 172	210 214	178 178	174 174	86 104	104 110	138 140
2	807	♂	мать 226, отец 33 или 85 mother 226, father 33 or 85	194 198	160 168	202 210	178 182	176 176	90 120	108 110	140 140
	226	♀	мать 89, отец 82 mother 89, father 82	186 198	160 168	210 210	178 182	174 176	104 120	104 110	140 140
	33	♂	из природы, Вост. Сибирь wild, Eastern Siberia	194 198	160 172	206 210	170 182	174 180	102 108	104 108	140 144
	85	♂	из природы, Зап. Сибирь wild, Western Siberia	194 198	160 168	202 210	174 178	174 176	90 116	104 108	138 140
3	? (502)	? ♀	?	160 168	194 202	210 214	174 174	178 178	102 120	100 110	138 140
	128	♀	мать 42, отец 37 mother 42, father 37	168 172	194 198	210 214	174 174	178 182	102 104	100 104	138 146
	82	♂	из природы, Вост. Сибирь wild, Eastern Siberia	160 160	186 202	206 210	174 174	178 182	86 120	104 110	140 140

Примечание к табл. 2 на стр.

Notes to the table 2 you can see in page

сопоставление аллелей генотипов птенцов и родителей позволило установить, что в первом случае отцом одного из стерхов Питомника является самец 646 (номер МПК – Международной племенной книги стерха), а самец 15 исключен по трем из восьми анализируемых локусов (*Gram-30*, *Gpa-12*, *Gpa-39*) (см. табл. 2). Во втором случае отцом птенца 807 оказался самец 85, а самец 33 исключен также по трем локусам (*Gpa-12*, *Gpa-32*, *Gpa-39*). Этот факт особенно интересен тем, что во время последовательного искусственного осеменения самки семенем разных самцов птенец вылупился из яйца, полученного непосредственно после осеменения спермой самца 33, тогда как семя самца 85 вводили этой самке на 5 дней раньше с целью оплодотворения предшествовавшего яйца. Следовательно, семя самца 85 смогло сохранить жизнеспособность и оплодотворить яйцеклетку после длительного пребывания в половых путях самки даже при более позднем введении семени другого самца. Возможно, именно появление «конкурентных» сперматозоидов спровоцировало активизацию и оплодотворяющую активность сперматозоидов, находившихся в половых путях самки уже несколько дней. Таким образом, отцовство последнего в череде последовательных осеменений самца не всегда очевидно.

Следующий пример использования данных микросателлитных локусов связан с генетической идентификацией особи неизвестного происхождения. Осенью 2003 г. в Челябинский зоопарк поступил раненный молодой стерх без колец. У птицы в нескольких местах было перебито крыло, поэтому местному ветеринару пришлось его ампутировать по плечевой сустав. По поведению стерха было сделано предположение, что он выращен людьми, а следовательно, с наибольшей вероятностью происходит из Питомника ОГПБЗ. Перед этим шесть молодых стерхов поколения 2003 г., рожденных в Питомнике, были выпущены в Куноватском заказнике на севере Западной Сибири. Одна из этих птиц воспитана родителями и поэтому должна была остаться дикой по отношению к человеку. Ее сразу исключили из списка возможных имен. Остальные пять птенцов воспитаны «костюмным» методом, поэтому среди них надо было определить таинственную птицу. Поскольку ей предстояло жить в Питомнике и приносить потомство, установление ее происхождения было необходимым для избежания инбридинга при скрещиваниях. Определение мультилокусного генотипа этого стерха и сопоставление его с генотипами родителей всех птенцов 2003 г. позволило идентифицировать ее как потомка пары родителей № МПК 128 и 82 (см. табл. 2, пример 3).

Выводы

Таким образом, стерхи из популяции, содержащейся в искусственно созданных условиях, характеризуются высоким генетическим разнообразием по микросателлитным локусам, а мультилокусные генотипы по набору из восьми полиморфных локусов являются уникаль-

Примечание к табл. 2: МПК № – Номер по Международной племенной книге – реестру сведений об особях редкого вида, содержащихся в неволе. В примерах 1 и 2 жирным шрифтом выделены многолокусные генотипы птиц, отцами которых при искусственном осеменении могли быть по два самца, а также показаны аллели, которые могли быть унаследованы от матерей и возможных отцов. Серым цветом фона по нескольким локусам обозначены генотипы самцов, исключающие их отцовство. В примере 3, разобранный в тексте, исходные номера птенца и родителей и пол птенца были неизвестны и определены в ходе микросателлитного анализа.

Notes to the table 2: ISCS No – Individual code in the International Siberian Crane Studbook containing information on all captive individuals of rare species. In the cases 1 and 2 multi-locus genotypes of birds with questionable paternity (two fathers) are boldfaced, as well as alleles inherited from mothers and putative fathers. Gray background indicates fathers which genotypes should be rejected. In the case 3 discussed in the text an individual code of a chick was initially unknown and was derived afterwards as a result of the microsatellite analysis.

ными генетическими портретами каждой птицы. Использование этих данных в племенном разведении поможет решить спорные вопросы отцовства и идентификации птиц неизвестного происхождения, избежать близкородственных скрещиваний и реконструировать генетические родословные стерхов искусственной популяции, для чего целесообразно включить генетических паспортов птиц в Международную племенную книгу стерха.

Благодарности

Авторы благодарят Е. Семенову и В. Василенко за предоставленный биологический материал стерхов из Таллинского и Калининградского зоопарков. Работа поддержана программами Президиума РАН «Биологическое разнообразие» (подпрограмма «Генофонды и генетическое разнообразие») и «Происхождение биосферы и эволюция био-геологических систем» (направление II).

Литература

- Hasegawa, O., Ishibashi, Y., and Abe, S. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the red-crowned crane *Grus japonensis*. – *Molecular Ecology*, 9: 1677-1678.
- Ivy, J.A., Lacy, R.C. 2010. Using molecular methods to improve the genetic management of captive breeding programs for threatened species. – *Molecular approaches in natural resource conservation and management* (J.A. DeWoody et al., eds). Cambridge University Press, Cambridge: 267-295.
- Jones, K.L., Glenn, T.C., Lacy, R.C., Pierce, J.R., Unruh, N., Mirande, C.M., and Chavez-Ramirez, F. 2002. Refining the Whooping Crane Studbook by incorporating microsatellite DNA and leg-banding analyses. – *Conservation Biology*, 16: 789-799.
- Jones, K.L., Henkel, J.R., Howard, J.J., Lance, S.L., Hagen, C., and Glenn, T. 2010. Isolation and characterization of 14 polymorphic microsatellite DNA loci for the endangered Whooping Crane (*Grus americana*) and their applicability to other crane species. – *Conservation Genetic Resources*.
- Jones, K.L., Nicolich, J. M. 2001. Artificial insemination in captive Whooping Cranes: Results from genetic analyses. – *Zoo Biology*, 20: 331-342.
- Lacy, R.C. 1994. Managing genetic diversity in captive populations of animals. – *Restoration of endangered species* (M.L. Bowles, C.J. Whelan, eds.). Cambridge University Press, Cambridge: 63-89.
- Meares, K., Dawson, D., Horsburgh, G., Perrin, M., Burke, T., and Taylor, T. 2008. Characterisation of 14 Blue Crane *Grus paradisea* (Gruidae, AVES) microsatellite loci for use in detecting illegal trade. – *Conservation Genetics*, 9: 1363–1367.
- Meine, C.D., Archibald, G.W. 1996. The Cranes: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, U.K.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. – *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. – *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. – *Biotechniques*, 10: 506-513.
- Zou, H.F., Dong, H.Y., Kong, W.Y., Ma, J.H., Liu, J.H. 2010. Characterization of 18 polymorphic microsatellite loci in the Red-crowned Crane (*Grus japonensis*), an endangered bird. – *Animal Science Journal*, 81: 519-522.

GENETIC DIVERSITY AND MULTI-LOCUS GENOTYPING OF THE SIBERIAN CRANE BY MICROSATELLITE LOCI

E.A. MUDRIK¹, T.A. KASHENTSEVA², D.V. POLITOV¹

¹*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences
E-mail: mudrik_len@mail.ru*

²*Oka Crane Breeding Centre
Oka State Nature Biosphere Reserve, Ryazan Region, Russia
E-mail: tk.ocbc@mail.ru*

Summary

Molecular genetic markers are proved to be effective tools in biodiversity exploration and management. For the first time in this species, we characterized genetic diversity of 49 individuals of the endangered Siberian crane, *Grus leucogeranus*, in the captive population using heterologous microsatellite loci. Level of genetic variability at eight microsatellite loci (*Gram-22*, *Gram-30*, *Gpa-12*, *Gpa-32*, *Gpa-36*, *Gpa-39*, *GjM-15*, *GjM-34*) was found to be relatively high and comparable to the data by those loci reported for other crane species. Allele numbers detected at each locus ranged from 3 to 9 (mean 5.6 ± 0.7), and the observed heterozygosity varied from 0.57 to 0.83 (mean 0.76 ± 0.04). Using multi-locus genotype of each studied individual, genetic identification of parents and their chicks raised in captivity and paternity questions under multiple male artificial inseminations were implemented. This set of loci is considered to be effective for genetic genotyping of birds in the captive population and refining the International Siberian Crane Stud-book by molecular data.

Key words: Siberian crane, microsatellite loci, allele, multi-locus genotype, genetic profiling

КОРМОВАЯ СТРАТЕГИЯ СЕМЕЙ СЕРЫХ ЖУРАВЛЕЙ НА ГНЕЗДОВЫХ ТЕРРИТОРИЯХ: ВЛИЯНИЕ ДОСТУПНОСТИ КОРМОВ НА ВЫБОР МЕСТООБИТАНИЙ

Г. НОВАЛЬД

*Журавлиный информационный центр, Штральзунд, Германия
E-mail: guenter.nowald@kraniche.de*

Введение

Птицы выбирают местообитания (Hildén, 1965) в соответствии с многими непосредственно действующими и имеющими историческое развитие факторами, такими как морфо-функциональные особенности вида, внутри- и межвидовая конкуренция, хищники, доступность пищевых ресурсов и структура мест обитания (Block & Brennan 1993).

Во время весенней миграции (Nowald, 1995) и на местах осенних предмиграционных скоплений (Alonso et al., 1994, 1995; Nowald, 1996) серые журавли предпочитают места обитания с наибольшей доступностью кормов или с наиболее энергоемкими кормами.