

Правительство Москвы
Moscow Government

Рабочая группа по журавлям Евразии
Crane Working Group of Eurasia

Евроазиатская Региональная Ассоциация Зоопарков и Аквариумов
Euro-Asian Regional Association of Zoo & Aquria

Московский зоологический парк
Moscow Zoo

ЖУРАВЛИ ЕВРАЗИИ

(БИОЛОГИЯ, ОХРАНА, РАЗВЕДЕНИЕ)

Выпуск 2

(ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ИЗДАНИЕ)

**СБОРНИК ТРУДОВ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ЖУРАВЛИ НА РУБЕЖЕ ТЫСЯЧЕЛЕТИЙ»
УКАРАИНА, АСКАНИЯ-НОВА, 7-11 ОКТЯБРЯ, 2003**



CRANES OF EURASIA

(BIOLOGY, PROTECTION, BREEDING IN CAPTIVITY)

ISSUE 2

(ADDITIONAL ISSUE)

**PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL CONFERENCE
«CRANES ON THE EDGE OF THE MILLENNIUMS»
UKRAINE, ASKANIA-NOVA, 7-11 OCTOBER 2003**

**Москва
Moscow
2005**

**Журавли Евразии (биология, охрана, разведение). 2006. М.,
Московский зоопарк, вып. 2 (дополнит. издание). 340 с.**

Сборник трудов Международной конференции «Журавли на рубеже тысячелетий» включает материалы, посвященные состоянию популяции журавлей, их современному распределению, численности, биологии, морфологии, охране, разведению в неволе и реинтродукции.

Редакторы: С. Вингер, Е. Ильяшенко
Перевод: И. Федосеева, Е. Пономарева
Макет обложки: С. Погонин
Компьютерный оригинал-макет: Е. Ильяшенко

Адрес РГЖ Евразии: 123242, Москва, ул. Б. Грузинская, 1.
Тел/факс: (495) 205-90-01, e-mail: eilyashenko@savingcranes.org

Издано при поддержке Московского зоопарка и Евроазиатской Региональной Ассоциации Зоопарков и Аквариумов

**Cranes of Eurasia (biology, protection, breeding in captivity).
2006. Moscow, Moscow Zoo, vol. 2 (additional issue). 340 p.**

Proceedings of the International Conference «Cranes on the Edge of the Millenniums» is included mainly scientific reports of this conference. Information about current situation with cranes population, their distribution, number, biology, morphology, protection, captive breeding and reintroduction are presented.

Editors: S. Winter, E. Ilyashenko
Translators: I. Fedoseeva, E. Ponomareva
Cover design: S. Pogonin
Computer design: E. Ilyashenko

CWGE address: B. Gruzinskaya str., 1, Moscow, 123242, Russia
Tel: (495) 205-90-01, e-mail: eilyashenko@savingcranes.org

The production of this publication has been supported by Moscow Zdz the Euro-Asia Association of Zoos and Aquariums

Формат 70 x 108/16. Объем 21,25 п.л. Тираж 150 экз. Заказ № 246.

Типография Россельхозакадемии 115598, Москва, ул. Ягодная, 12

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ЖУРАВЛЕЙ ПО ДНК

О. Н. НЕСТЕРЕНКО

Московский зоопарк

Россия, 123242, Москва, ул. Б. Грузинская, 1. E-mail: zoosci@cdt.ru

Введение

Помимо охраны журавлей в природе, редких журавлей разводят в специализированных питомниках и зоопарках. Разведение редких видов в неволе -необходимая часть природоохранной работы (Проект Стратегии сохранения редких видов животных, 2000). Во многом благодаря разведению в неволе, численность американского журавля увеличилась с 14-16 в 1940 до почти 400 птиц сейчас. Во Всемирной стратегии охраны животных зоопарками (WZCS) указано, что разведение в неволе – часто единственный выход для видов, находящихся на грани исчезновения (WZCS, 1993).

Для успешного разведения птиц важно правильно сформировать пары. Журавли не имеют четко выраженного полового диморфизма. Морфологические промеры, определение пола по поведению не являются надежными методами. Морфологические промеры могут быть ошибочны из-за индивидуальных отклонений от средних размеров, характерных для данного пола. В гомосексуальных парах одна особь ведет себя как представитель другого пола. Так, в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника четыре молодых даурских журавля образовали две пары (впоследствии оказалось, что все птицы - самки). Одна из этих самок исполняла самцовую партию унисонального крика (Панченко, Кашенцева, 1995). Лапароскопия годится только для взрослых птиц, определение пола у неполовозрелых птиц затруднительно, в то время как пол часто необходимо определять у птенцов, так как они обычно их передают в другие зоопарки и питомники.

В Московском зоопарке несколько лет проводили определение пола птиц по кариотипам, методом культивации лейкоцитов. Однако этот метод для определения пола птиц имел свои сложности, так как сильно зависел от состава крови, требовал “свежей” крови- живых лейкоцитов (кровь следовало доставить в лабораторию в течение 2-х максимум 3-х дней, сохраняя ее при температуре +3-+4° С). Кроме того, культура лейкоцитов птиц более “капризна” чем у млекопитающих: труднее добиться хорошего деления лейкоцитов.

В 2001 г. по инициативе Рабочей группы по журавлям Евразии проведен семинар по использованию генетических методов в работе по разведению редких журавлей. Затем на базе Медико-генетического центра нами начата работа по определению пола птиц методом ПЦР (полимеразно-цепная реакция), разработанным Р. Гриффитсом (Griffiths at al., 1998).

Что такое полимеразно-цепная реакция (ПЦР)? В настоящее время возможно размножить (амплифицировать) в специальных приборах фрагменты ДНК, выделенные специальными затравками (праймерами). Метод ПЦР, или специфической амплификации ДНК позволяет избирательно синтезировать *in vitro* небольшие участки ДНК длиной от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов, реже до 1000-2000 пн, используя в качестве матрицы любые образцы ДНК, содержащие амплифицируемую последовательность (Глазко и др., 2001). Или другими словами полимеразно-цепная реакция - это реакция увеличивающая (амплифицирующая) количество копий избирательных фрагментов ДНК в специальном приборе-амплификаторе, используя в качестве матрицы образцы ДНК. В приборе (амплификаторе) можно получить, благодаря проводимой там полимеразно-цепной реакции, десятки тысяч копий выделенного участка ДНК, достаточных для дальнейшего анализа.

Суть метода Гриффитса заключается в том, что был найден ген белка хромобохеликазы ДНК (CHD), который находится на половых хромосомах птиц. У птиц гетерогаметный пол - самки (хромосомы ZW), а гомогаметный пол - самцы (их половые хромосомы ZZ). Любой ген состоит из кодирующей области - экзона и некодирующей - интронов. Экзоны гена хромобохеликазы ДНК одинаковы на обеих половых хромосомах, а интроны имеют разный размер на Z и W - хромосомах. Таким образом, у самцов при амплификации гена хромобохеликазы образуются фрагменты ДНК одинаковой длины, а у самок - разной. Следующий этап - анализ в геле в электрофоретической камере. ДНК - отрицательно заряжена, в электрофоретической камере под действием тока двигается от отрицательного к положительному полюсу. Но скорость передвижения зависит от размера фрагментов ДНК: короткие движутся быстрее длинных. Поэтому, после внесения в гель полученных продуктов реакции и проведения электрофореза, у самок в ультрафиолетовом свете можно видеть две светящиеся полосы, а у самцов - одну.

Методы

ДНК можно выделять из крови и перьев птиц. Так как эритроциты птиц, в отличие от млекопитающих, имеют ядра, то для выделения нужного количества ДНК достаточно небольшого количества крови - капли на фильтровальной бумаге. Особенно много ДНК выделяется из молодых, растущих ("кровяных") перьев. При отправке на анализ следует следить, чтобы не произошло загрязнения образца чужеродной ДНК - образцы с кровью на фильтровальной бумаге следует подсушить и разложить по отдельным конвертам, подписав конверт (указать вид птиц, номер или кличку). Нельзя класть одну бумагу с кровью на другую. Перья следует разложить в отдельные конверты. Такие образцы могут храниться весьма долго.

Выделение ДНК проводили фенольно-хлороформным способом. До выделения, образцы помещали в термостат на 10-20 часов (перья на более длительное время, чем кровь) при +37°C в растворе 500 мл буфера STE, 100 мл 20% SDS, 2 микролитра протеиназы К.

Условия реакции соблюдались по Гриффитсу (Griffiths at al., 1998). Концентрацию ДНК брали от 100 до 300 ng/микролитр.

Для журавлей характерна небольшая разница в длинах фрагментов ДНК у самцов и самок, поэтому мы использовали акриламидный гель (а не агарозный). Наименьшая разница в длинах фрагментов характерна для венценосных журавлей. Для определения пола птиц использовали 6% акриламидный гель и проводили электрофорез не менее 55 мин при напряженности 10-15 v/sm. Наибольшая разница в длинах фрагментов ДНК из исследуемых нами видов - у красавок.

Нами определен пол у японских (45 птиц), даурских (14), венценосных (5), серых (10) журавлей, стерхов (58) и красавок (16), из Питомника Окского заповедника, Московского, Ленинградского, Ивановского, Пензенского, Красноярского и Таллинского зоопарков.

Выводы

В настоящее время мы подобрали необходимые условия для определения пола всех вышеперечисленных журавлей.

Данная методика позволяет обслуживать в одной лаборатории птиц из разных регионов страны. Возможно ее применение для изучения соотношения полов птиц из природы.

Попутно с работой по определению пола птиц, мы создаем коллекцию ДНК редких птиц, содержащихся в неволе, которую можно использовать для других генетических исследований.

Благодарим К. Джонса (Чикаго), за семинар и помощь реактивами и оборудованием, членов Рабочей группы по журавлям Евразии Е. Ильяшенко, О. Роздину, Т. Кашенцеву за

организацию семинара, сотрудников лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического центра Т.А. и А.А. Букиных, Е.Ю. Захарову, Е.Ю. Воскобоеву за предоставление оборудования и помощь в работе.

Литература

- Глазко В.И., Шульга Е.В., Дымань Т.Н., Глазко Г.В. 2001. ДНК- технологии биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих. Белая церковь.
- Панченко В.Г., Кашенцева Т.А. 1995. Размножение журавлей в питомнике Окского заповедника. - Научные основы охраны и рационального использования птиц. Труды Окского биосферного государственного заповедника. Рязань, 19: 236-270.
- Стратегия сохранения редких видов России (проект). 2000. Природа МПР России. М.
- Griffiths R., Double M. C., Orr K. and Dawson R. J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. - *Molecular Ecology*. 7: 1071-1075.
- The World Zoo Conservation Strategy Published by the Chicago Zoological Society. 1993. USA.

DETERMINING THE SEX OF CRANES BY DNA

O. N. NESTERENKO

Moscow Zoo

B. Gruzinskaya Str., 1, Moscow, 123242, Russia. E-mail: zoosci@cdt.ru

Summary

The fact that cranes do not have sexual dimorphism should be the reason for their unsuccessful breeding in captivity. We successfully determine the sex of birds by the PCR- based method (based on two conserved CHD - genes) (Richard Griffiths et al 1998). DNA is isolated from blood or feather samples.

We successfully sexed the following cranes: Demoiselle Cranes *Anthropoides virgo*; Red-crowned Cranes *Grus japonensis*; Siberian Cranes *G. leucogeranus*; Eurasian Cranes *G. grus*; White-naped Cranes *G. vipio*, Crowned Crane *Balearica pavonina*.

This method permits to store feather and blood samples for a long time as well as to transport them to far-away destinations. Thus, it is useful for studying sex ratios in wild populations of birds.

Special thanks to Kenneth I. Jones (University of Illinois-Chicago) who was my guide to this method and to the Crane Working Group of Eurasia for their support.

Key words: cranes, sex dimorphism