

Рабочая группа по журавлям Евразии  
Crane Working Group of Eurasia

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН  
A.N. Severtsov' Institute of Ecology and Evolution RAS

Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации  
Ministry of Natural Resources and Environment of the Russian Federation

Государственный природный биосферный заповедник "Даурский"  
Daursky State Nature Biosphere Reserve

Амурский филиал ВВФ России  
Amur Branch of WWF Russia

# ЖУРАВЛИ ЕВРАЗИИ

(БИОЛОГИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ, РАЗВЕДЕНИЕ)

**Выпуск 5**

**СБОРНИК ТРУДОВ IV МЕЖДУНАРОДНОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
"ЖУРАВЛИ ПАЛЕАРКТИКИ: БИОЛОГИЯ, ОХРАНА, УПРАВЛЕНИЕ"**

**Государственный природный биосферный заповедник "Даурский",  
ЗАБАЙКАЛЬСКИЙ КРАЙ, РОССИЯ  
1-4 СЕНТЯБРЯ 2015 г.**



# CRANES OF EURASIA

(BIOLOGY, DISTRIBUTION, CAPTIVE BREEDING)

**ISSUE 5**

**PROCEEDINGS OF THE IV INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE  
"CRANES OF PALEARCTIC: BIOLOGY, CONSERVATION, MANAGEMENT"**

**DAURSKY STATE NATURE BIOSPHERE RESERVE,  
ZABAIKALSKY KRAI, RUSSIA  
1-4 SEPTEMBER 2015**

Москва - Нижний Цасучей, 2015  
Moscow - Nizhny Tsasuchey, 2015

**Журавли Евразии (биология, распространение, разведение). 2015.  
(Е.И. Ильяшенко, С.В. Винтер, ред.). Вып. 5. М.-Нижний Цасучей. 504 с.**

Сборник трудов IV Международной научной конференции “Журавли Палеарктики: биология, охрана, управление” включает статьи по биологии, распространению, численности, миграциям, зимовкам, разведению, реинтродукции, управлению популяциями журавлей и экологическому просвещению.

Корректор английского текста: Беверли Пфистер

Фотография на передней обложке: О.А. Горошко: Гнездование даурского журавля в Монголии в период засухи

**Издано при финансовой поддержке Государственного природного биосферного заповедника “Даурский”, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-20636) и Амурского филиала WWF России (грант WWF673/RU009606-15/GLM)**

Утверждено к печати Учёным советом ИПЭЭ РАН

Рецензенты: д.б.н., проф. А.Ф. Ковшарь, к.б.н. В.А. Зубакин

© коллектив авторов, 2015

© Рабочая группа по журавлям Евразии, 2015

© ИПЭЭ РАН, 2015

© Государственный природный биосферный заповедник “Даурский”, 2015

**Cranes of Eurasia (Biology, Distrubution, Captive Breeding). 2015.  
(E.I. Ilyashenko, S.W. Winter, eds). Vol. 5. Moscow-Nizhny Tsasuchei, 504 p.**

Proceedings of the IV International Scientific Conference of “Cranes of Palearctic: Biology, Conservation, Management” include scientific articles on crane biology, distribution, number, migrations, captive breeding, reintroduction, population management, ecological education.

Editor of English text: Beverly Pfister

Photo on the front cover by O. Goroshko: Breeding of the White-naped Crane in Mongolia during drought

**Supported by Daursky State Nature Biosphere Reserve, Russian Foundation for Basic Research (the project 15-04-20636) and Amur Branch of WWF Russia (the project WWF673/RU009606-15/GLM)**

Approved for printing by Scientific Council of A.N. Severtsov’ Institute of Ecology and Evolution RAS

Reviewers: Dr. A.F. Kovshar, Dr. V.A. Zubakin

© team of authors, 2015

© Crane Working Group of Eurasia, 2015

© A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, 2015

© Daursky State Nature Biosphere Reserve, 2015

## РЕКОМЕНДАЦИИ К ПРИМЕНЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В РАЗВЕДЕНИИ И РЕИНТРОДУКЦИИ СТЕРХА

Е.А. Мудрик<sup>1</sup>, Т.А. Кашенцева<sup>2</sup>, Д.В. Политов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup>Питомник редких видов журавлей, Окский государственный природный  
биосферный заповедник, пос. Брыкин Бор, Рязанская область, Россия

E-mail: mudrik@vigg.ru

### Резюме

В сообщении изложены молекулярно-генетические подходы к разведению и реинтродукции стерха (*Leucogeranus leucogeranus*) в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника. Сформулированы рекомендации по применению генетических методов в программе сохранения стерха, включающие индивидуальную генетическую паспортизацию, оценку генетического разнообразия в разных поколениях производителей, установление генетического родства, анализ отцовства, предотвращение инбридинга и определению пола в искусственной популяции.

**Ключевые слова:** стерх, искусственная популяция, генетическое разнообразие, инбридинг, родство, отцовство, определение пола, микросателлитные локусы

### Введение

Основной целью разведения редких видов животных является создание самодостаточной искусственной популяции с разнообразным генофондом, способной к воспроизводству генетически здорового потомства. Объективные трудности искусственного разведения заключаются в том, что такие популяции состоят из небольшого числа особей, а процесс их размножения часто сопровождается слабой фертильностью или бесплодностью, генетической или поведенческой несовместимостью, низкой неонатальной выживаемостью, высокой смертностью на всех этапах онтогенеза и инбридингом (Lacy, 1994; Snyder et al., 1996). Если искусственное разведение не ограничивается только экспозиционными потребностями зоопарков и научной или образовательной деятельностью, но направлено на реинтродукцию, его задачи усложняются получением полноценного потомства, способного жить и размножаться в естественной среде обитания. Такие особи должны обладать всеми необходимыми инстинктами и рефлексам, быть физически здоровыми и не прирученными к человеку.

В мировой практике разведения редких видов животных известны успешные случаи восстановления исчезнувших видов. Так, при размножении небольшого количества особей в неволе были спасены от окончательного вымирания и частично восстановлены в природе полностью истреблённые лошадь Пржевальского (*Equus ferus przewalskii* Poliakov), калифорнийский кондор (*Gymnogyps californianus* Shaw), черноногий хорек (*Mustela nigripes* Audubon & Bachman) (Ivy, Lacy, 2010). Для некоторых практически исчезнувших видов были созданы новые природные популяции из особей, полученных в центрах размножения. Этот пример включает самого

редкого вида журавлей — американского (*Grus americana*), современное распространение которого в природе представлено сохранившейся малочисленной дикой популяцией и несколькими экспериментальными популяциями вне исторической гнездовой части ареала (Meine, Archibald, 1996; Archibald, 2011). Однако новые популяции сталкиваются с соответствующими новыми трудностями, вызванными изменениями условий для размножения. У американского журавля это приводит к низкому репродуктивному успеху и высокой смертности птенцов (King et al., 2013).

Несмотря на высокую затратность и непредсказуемость работ по сохранению и восстановлению редких видов, они осуществляются в разных странах мира, включая Россию. Для повышения эффективности многих программ искусственного разведения применяются молекулярно-генетические методы, позволяющие определять уровни генетического разнообразия и дифференциации размножаемых особей; устанавливать их географические происхождение и генетическое родство; оценивать степень инбридинга; идентифицировать виды, подвиды и гибриды; диагностировать пол; сопоставлять генетическую информацию с данными племенных книг (Ivy, Lacy, 2010).

Стерх (*Leucogeranus leucogeranus*) — один из самых малочисленных видов журавлей, редкий исчезающий вид мировой орнитофауны, эндемик Российской Федерации. Программа по его разведению и реинтродукции осуществляется в Питомнике редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника с конца 1970-х гг. Половина маточного поголовья современной искусственной популяции (основатели) выращена из яиц, взятых из гнёзд стерхов в природе, вторая половина представлена птицами первого и второго поколений, выращенных в искусственных условиях. Для максимальной эффективности размножения стерхов в Питомнике использованы разнообразные методы повышенной продуктивности, главным образом искусственное осеменение. Ежегодно получают потомство, предназначенное к выпуску в места гнездования и пролёта исчезающей западносибирской (обской) популяции для её восстановления, а также для экспериментальных работ по поиску новых мест гнездования этого вида. С целью усовершенствования качества разведения нами выработаны следующие рекомендации к применению молекулярно-генетических методов в программе сохранения и реинтродукции стерха.

### **Рекомендации по индивидуальной генетической паспортизации**

Индивидуальная генетическая паспортизация в племенном размножении, как правило, необходима для идентификационных целей. Для создания базы индивидуальных генетических профилей стерхов мы используем генотипирование всех особей по 10 полиморфным микросателлитным локусам: Gram-22, Gram-30, Gra-12, Gra-38, Gra-39, Gj-M15, Gj-M34, Gj-4066, Gj-8077, Gj-2298 (Мудрик и др., 2014а; 2015а). По этим локусам нами было идентифицировано 64 аллеля, а поскольку их комбинации для каждой особи уникальны, это позволяет различать между собой не только случайных птиц, но даже близких родственников по вертикальной и горизонтальным линиям. Благодаря генетической паспортизации размножающихся стерхов и их потомков нами идентифицированы две птицы (МПК 502 и 929), возвращённые из природы без колец после неудавшейся реинтродукции. Мы осуществляем генетическую паспортизацию всех доступных для анализа образцов стерхов, не только современных, но и архивных. На основе такой первичной информации

по количеству и составу аллелей микросателлитных локусов возможно проведение дальнейшего анализа состояния генофонда искусственной популяции стерха.

### **Рекомендации по оценке генетического разнообразия**

Анализ генетического разнообразия искусственных популяций необходим для выявления рисков, связанных с обеднением генофондов редких видов животных при длительном разведении в неволе. Для полноценного существования и размножения искусственной популяции её генофонд должен представлять в миниатюре генофонд естественной популяции, т.е. уровень генетического разнообразия искусственных популяций должен быть сопоставим с природными популяциями. Микросателлитные локусы относятся к маркерам изменчивости ядерного генома. Анализ генетического разнообразия по набору из 10 вышеперечисленных микросателлитных локусов дает представление о состоянии генофонда искусственной популяции. Так, выборка стерхов природного происхождения, основавшая популяцию Питомника, характеризовалась высокими значениями ожидаемой ( $HE = 0.757$ ) и наблюдаемой ( $HO = 0.782$ ) гетерозиготности и средним числом аллелей на локус: 7.25 (Мудрик и др., 2015б). Ввиду отсутствия другого биологического материала от стерхов из природы, эти данные нельзя сравнить с современным генетическим разнообразием природной популяции стерха. Однако эти значения высоки и сопоставимы с данными о генетическом разнообразии по микросателлитным локусам у других видов журавлей.

Помимо оценки уровня генетического разнообразия основателей искусственной популяции, необходим анализ его поддержания или динамики в потомстве. Это важно как для формирования последующих поколений производителей, так и для выращивания стерхов, предназначенных к реинтродукции. В целом нами было показано, что в потомстве популяции стерха Питомника сохраняется уровень исходной генетической изменчивости, однако в небольших выборках производителей из первого и второго поколений наблюдается потеря аллельного разнообразия. В связи с этим выборки молодых производителей нуждаются в повышении генетической гетерогенности путем целенаправленных скрещиваний основателей с нужными ценными аллелями либо привлечения неродственных особей из других центров разведения.

### **Рекомендации по установлению генетического родства**

Оценка генетического родства подразумевает как определение степени родственных отношений, так и выявление генетического сходства аллелей случайных особей. Коэффициент родства  $R$  между двумя особями является вероятностью того, что по данному локусу аллель, обнаруженный у одной особи, имеет общее происхождение как минимум с одним аллелем сравниваемой особи (Ivy, Lacy, 2010). Для племенного разведения важность анализа генетического родства обусловлена необходимостью поддержания генетической гетерогенности производителей и целенаправленного планирования скрещиваний. Значения  $R$  варьируют в пределах от 0 до 1, где нуль и близкие к нему значения указывают на отсутствие генетического родства между сравниваемыми особями, полное генетическое сходство принимается за единицу, родство между сибсами и полусибсами выражается как 0.5 и 0.25, соответственно.

По данным значений коэффициента  $R$ , рассчитанного по микросателлитным локусам в разных поколениях искусственной популяции стерха, генетическое родство между основателями этой популяции отсутствует ( $R = -0.079$ ). Потомки основателей из разных поколений ( $F1$ ,  $F1/F2$  и  $F1/F3$ ) характеризуются низкой степенью родства ( $R = -0.079-0.08$ ), тогда как поколение  $F2$  является максимально родственным ( $R = 0.302$ ). Производители из поколений  $F1$  и  $F2$  также демонстрируют повышенную степень родства ( $R = 0.164$ ) (Мудрик и др., 2014б). Это указывает на важность снижения данного показателя среди производителей и необходимость его дальнейшего учёта и контроля при планировании скрещиваний.

### **Рекомендации по анализу отцовства**

ДНК-анализ отцовства в искусственной популяции стерха необходимо проводить в связи с применением искусственного осеменения для размножения импринтированных самок. С целью увеличения шансов оплодотворения, для инсеминаций используют сперму разных самцов-доноров. Сперматозоиды стерхов, как и других видов журавлей и вообще большинства позвоночных животных, способны к длительному сохранению жизне- и конкурентоспособности в половых путях самки: до 15 суток (Мудрик и др., 2015б). Таким образом, любой донор, чью сперму использовали в осеменениях до откладки оплодотворенного яйца, может оказаться биологическим отцом птенца.

Для установления отцовства проводят сравнение матриц генотипов, полученных по микросателлитным локусам у потомков и участвовавших в осеменении самок и самцов, с последующей идентификацией аллелей, унаследованных птенцом от матери и отца (Мудрик и др., 2014а; 2015а). К настоящему времени нами показано, что у птенцов с установленным отцовством в 2/3 случаях отцом является последний донор спермы, в 1/3 – самец, чью сперму использовали в начале или середине цикла осеменений. В редких случаях в парах импринтированных стерхов оплодотворение происходит в результате естественной копуляции несмотря на регулярное осеменение самок донорской спермой. Таким образом, многократные искусственные осеменения и непредсказуемые факты спариваний импринтированных и травмированных птиц вызывают необходимость анализа отцовства для ведения родословной искусственной популяции стерха и будущего формирования партнёров для естественного размножения и искусственного осеменения.

### **Рекомендации по предотвращению инбридинга**

Инбридинг как результат близкородственных скрещиваний проявляется в снижении адаптивных возможностей потомков и популяции в целом, а также в дефектах потомства, порой несовместимых с жизнью. Самые распространенные последствия близкородственных скрещиваний в изучаемой популяции стерха заключаются в нежизнеспособности и гибели эмбрионов на ранних стадиях развития и патологических нарушениях опорно-двигательного аппарата у птенцов (Мудрик и др., 2015а). Наиболее тяжелые последствия инбридинга наблюдались при ошибочном искусственном осеменении самок спермой их отцов или сыновей, а также при неконтролируемых спариваниях импринтированных сибсов. Для предотвращения инбридинга необходимо планирование искусственных осеменений и формирование пар



для естественного размножения с учётом родственных отношений объединяемых птиц, установленных в результате анализа отцовства и генетического родства.

### **Рекомендации по определению пола**

Диагностика пола с помощью сцепленных с полом молекулярно-генетических маркеров позволяет определять половую принадлежность на разных стадиях онтогенеза организма. В искусственном разведении определение пола имеет большое значение для формирования брачных пар, учёта полового состава реинтродуцированных особей, ведения родословной в Международной и Европейской племенных книгах. Для ДНК-анализа полового статуса у стерхов используют универсальные маркеры пола птиц: интрон гена хромохеликазы CHD1 (Нестеренко, 2004) и уникальную последовательность W-хромосомы EE0.6 (Мудрик и др., 2013а,б). У гетерогаметных (WZ) самок птиц маркеры пола имеют два варианта фрагментов длины, а у гомогаметных (ZZ) самцов — один, в результате чего электрофоретические спектры продуктов амплификации у самок и самцов представлены двумя и одной полосами, соответственно. У птенцов определение пола можно осуществлять неинвазивным методом путем анализа ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантаоиса яйца после вылупления (Мудрик и др., 2013а). В целом в искусственной популяции стерха в Питомнике ежегодно появляется на свет равное количество самок и самцов как у естественно размножающихся, так и у искусственно осеменяемых самок (Мудрик и др., 2015в).

### **Выводы**

Применение молекулярно-генетических методов в программе сохранения и реинтродукции стерха способствует улучшению племенной работы по получению генетически здорового потомства для последующего разведения в искусственно созданных условиях и выпуска в естественную среду обитания. Это происходит за счёт контроля процесса размножения, обеспечивающего сохранение генетического разнообразия и избегающего близкородственных скрещиваний. Данную работу нужно продолжать и совершенствовать, привлекая другие молекулярно-генетические маркеры, например, отражающие генетическую совместимость половых партнёров и определяющие иммунный ответ каждой особи.

### **Благодарность**

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации МК-1900.2014.4, программами фундаментальных исследований Президиума РАН “Биоразнообразие природных систем” (подпрограмма “Генофонды живой природы и их сохранение”) и “Эволюция органического мира и планетарных процессов” (подпрограмма 2), а также Комплексной международной научно-производственной программой Евразийской региональной ассоциации зоопарков и аквариумов (ЕАРАЗА) “Сохранение журавлей Евразии”.

## Литература

- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Гаврикова Е.Ю., Политов Д.В. 2013а. Неинвазивный метод идентификации пола птенцов журавлей по ДНК из капиллярных сосудов аллантаоиса. — Онтогенез. 44(5): 372–376.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. 2013б. Определение пола у десяти видов журавлей с помощью ДНК-маркера EE0.6. — Генетика. 49(12): 1254–1257.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. 2014а. Генетическая паспортизация и идентификация стерхов (*Grus leucogeranus* Pallas) в искусственно созданных условиях. — Известия РАН. Серия биологическая. 41(3): 219–227.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Постельных К.А., Носаченко Г.В., Политов Д.В. 2014б. Генетическое разнообразие и родство в разных поколениях искусственной популяции стерха (*Grus leucogeranus* Pallas). — Генетика. 50(11): 1345–1353.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Политов Д.В. 2015а. Интеграция молекулярно-генетических подходов в программу создания резервного генофонда редкого вида журавлей стерха (*Grus leucogeranus* Pallas). — Успехи современной биологии. 135(2): 139–147.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Политов Д.В. 2015б. Анализ отцовства у стерхов: длительное переживание сперматозоидов и скрытый выбор самки. — Программа и тезисы IV Междунар. конф. “Журавли Палеарктики (биология, охрана, управление)” (ГПБЗ “Дарурский”, Забайкальский край, 1–4 сентября 2015 г.). Москва – Нижний Цасучей, РГЖЕ: 80–81.
- Нестеренко О.Н. 2004. Определение пола птиц по ДНК. — Научные исследования в зоологических парках. Вып. 17: 99–102.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Постельных К.А., Носаченко Г.В., Политов Д.В. 2015в. Соотношение полов в потомстве искусственной популяции стерха (*Grus leucogeranus* Pallas). — Генетика. 51(12): 1439–1443.
- Archibald, G. 2011. Conservation of the rarest of cranes, the Whooping crane. — Cranes of Eurasia (biology, distribution, migrations, management). Issue 4. Moscow: 396–401.
- 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 / Eds. DeWoody J.A. Cambridge: Cambridge University Press: 267–295.
- King, R.S., Espenshade, J.L., Kirkpatrick-Wahl, S.K., Lapinski, M.K., Malekan, I., Rickett, J.M. 2013. Whooping crane *Grus americana* chick mortality and management intervention. — Wildlife Biology. 19 (4): 420–428.
- Lacy, R.C. 1994. Managing genetic diversity in captive populations of animals. — Restoration of endangered species / Eds. Bowles M.L., Whelan, C.J. Cambridge: Cambridge University Press: 63–89.
- Meine, C.D., Archibald G.W. 1996. The cranes: Status survey and conservation action plan. Gland, Switzerland: IUCN, 294 p.
- Snyder, N. F. R., Derrickson S. R., Beissinger S. R., Wiley J. W., Smith T. B., Toone W. D., Miller, B. 1996. Limitations of captive breeding in endangered species recovery. — Conservation Biology. 10(2): 338–348.



## GUIDELINES FOR USE OF MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR THE SIBERIAN CRANE CAPTIVE BREEDING AND REINTRODUCTION

E.A. MUDRIK<sup>1</sup>, T.A. KASHENTSEVA<sup>2</sup>, D.V. POLITOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*Oka Crane Breeding Center, Oka State Nature Reserve, Brykin Bor, Ryazan Region, Russia*

*E-mail: mudrik@vigg.ru*

### Summary

The paper provides the molecular-genetic approach for captive breeding and reintroduction of the rare Siberian crane (*Leucogeranus leucogeranus*) in Oka Crane Breeding Center. The guidelines for use of genetic methods in the Siberian Crane conservation program are presented by individual genetic certification, estimation of genetic diversity in the different generations, relatedness and paternity analyses, inbreeding avoidance and sex determination in the captive population.

**Keywords:** Siberian Crane, captive population, genetic diversity, inbreeding, relatedness, paternity, sex determination, microsatellite loci