ОНТОГЕНЕЗ, 2013, том 44, № 5, с. 372–376

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.18:598.241.2

НЕИНВАЗИВНЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛА ПТЕНЦОВ ЖУРАВЛЕЙ ПО ДНК ИЗ КАПИЛЛЯРНЫХ СОСУДОВ АЛЛАНТОИСА

© 2013 г. Е. А. Мудрик, Т. А. Кашенцева*, Е. А. Гамбург, Е. Ю. Гаврикова**, Д. В. Политов

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д.3
**Питомник редких видов журавлей, Окский государственный заповедник*
391072 Рязанская обл., Спасский р-он, п. Брыкин Бор
***Станция реинтродукции редких видов птиц, Хинганский государственный природный заповедник*
675740, Амурская обл., п. Архара
E-mail: mudrik@vigg.ru

Поступила в редакцию 27.02.13 г.
Окончательный вариант получен 11.04.13 г.

На четырех видах журавлей (подсем. Gruinae, Aves), размножавшихся в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника в течение 2009–2012 гг., продемонстрирован неинвазивный метод определения пола птенцов после их вылупления на основе ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантоиса подскорлуповых оболочек яиц. Используя молекулярный маркер пола EE0.6, установлен пол 26 птенцов стерха *Grus leucogeranus*, 15 птенцов японского журавля *G. japonensis*, четырех птенцов серого журавля *G. grus* и одного птенца журавля-красавки *Anthropoides virgo*. Данный метод может быть рекомендован для определения пола птенцов и соотношения полов у журавлей, размножающихся как в искусственных условиях, так и в природных популяциях.

Ключевые слова: журавли, определение пола, аллантоис, подскорлуповая оболочка, ДНК, неинвазивные молекулярные методы.

DOI: 10.7868/S0475145013050054

Птицы семейства Журавлиных (*Gruidae*) не обладают выраженным внешним половым диморфизмом. Как правило, самцы журавлей крупнее, чем самки (Флинт, 1987), однако использование лишь размерно-весовых критериев не гарантирует установление пола даже у взрослой птицы (Swengel, 1996). Акустический метод позволяет определять пол журавлей по особенностям вокализации не ранее, чем в возрасте 8–12 месяцев, когда происходит “голосовое созревание” птиц (Walkinshaw, 1973). Показано, что самцы издают более низкие звуки, чем самки (Carlson, Trost, 1992; Брагина, Бёме, 2007), но чаще всего это можно установить только при исполнении унисональных криков в дуэте с брачным партнером (Archibald, 1976; Swengel, 1996). Определение пола у птенцов журавлей еще более затруднительно не только в связи с отсутствием морфометрических различий, но и различий в свистовых звуках (Кленова и др., 2005; 2008). Вместе с тем, проблема половой дифференциации птенцов чрезвычайно актуальна при разведении журавлей в искусственных условиях и для ведения племенных книг, поскольку большинство видов этих птиц являются редкими и охраняемыми как в России, так и в мире (Meine, Archibald, 1996).

Наиболее точная половая идентификация птиц, в том числе на ранних этапах онтогенеза, достигается с помощью анализа изменчивости генов, локализованных в половых хромосомах у гетерогаметных самок (кариотип WZ) и гомогаметных самцов (ZZ). Наиболее распространенными ДНК-маркерами пола у птиц являются ген хромохеликазы (Ellegren, 1996; Griffiths et al., 1996; 1998) и уникальная последовательность W-хромосомы EE0.6 (0.6 т.п.н. фрагмент *Eco*RI) (Ogawa et al., 1997; Itoh et al., 2001). Механизм определения пола с помощью маркера EE0.6 заключается в выявлении специфической последовательности фиксированного размера на W-хромосоме самок. При этом данный маркер содержит общий для самцов и самок Z/W внутренний контроль, являющийся частью экзона – консервативной последовательности сцепленного с полом гена (Itoh

et al., 2001). Таким образом, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) у самцов амплифицируется один фрагмент ДНК известной длины, дающий на электрофореграмме однополосный спектр, а у самок – два ПЦР-продукта, один из которых совпадает по размеру с "мужским" фрагментом, а другой специфичен только для самок (двухполосный спектр).

Для молекулярной диагностики пола птенцов первых месяцев жизни забор крови представляет очевидный риск, поэтому неинвазивные методы получения материала – источника ДНК особенно важны. Капиллярные сосуды в аллантоисе яйца являются частью кровеносной системы птенца – их сообщение с пупочными сосудами обеспечивает дыхательную и выделительную функции развивающегося эмбриона (Гилберт, 1993). После успешного вылупления птенца в подскорлуповой оболочке яйца остается редуцированный аллантоис, часто с сохранившими капиллярными сосудами, которые могут служить материалом для выделения ДНК (рис. 1). Об использовании сосудов аллантоиса как источника ДНК для определения пола у эмбрионов и "новорожденных" птенцов известно из работ по домашним птицам (Turkyilmaz et al., 2010; Bozkayaa et al., 2013). Сведения о применении этого метода у редких видов птиц, разводимых в искусственных условиях или размножающихся в природе, отсутствуют. Поскольку в центрах разведения журавлей существует практика сохранения и поддержания маркированных коллекций скорлупы яиц, мы обратили внимание на возможность использования таких коллекций для определения пола вылупившихся птенцов.

В течение четырех сезонов размножения (2009–2012 гг.) журавлей в Питомнике редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника (далее – Питомник) мы тестировали методику молекулярного определения пола на 44 птенцах четырех видов журавлей с использованием капиллярных сосудов аллантоиса (таблица). Аллантоис яиц удалось взять для генетического анализа не от всех птенцов и не от всех содержащихся в Питомнике видов журавлей, поскольку во многих случаях родители съедали скорлупу сразу после вылупления птенцов. Всего доступными для работы оказались подскорлуповые оболочки 26 яиц стерха (*Grus leucogeranus* Pallas), четырех яиц серого журавля (*G. grus* L.,) и одного яйца журавля-красавки (*Anthropoides virgo* L.). Кроме того, подскорлуповые оболочки 15 яиц японского журавля (*Grus japonensis* Muller) были получены со Станции реинтродукции редких видов птиц Хинганского государственного природного заповедника. В 2009–2012 гг. на Станцию реинтродукции были переданы яйца от

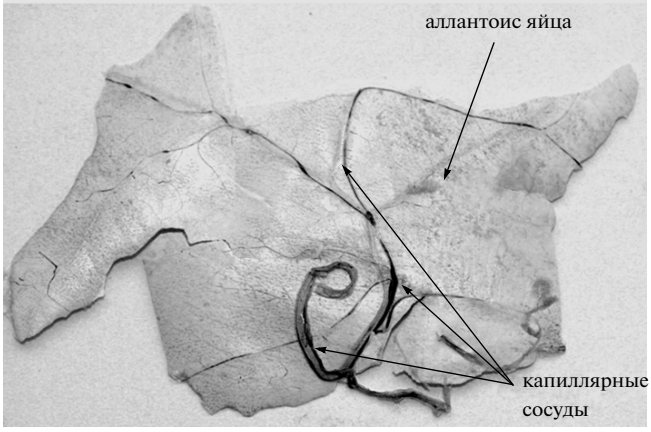

Рис. 1. Фотография аллантоиса яйца японского журавля с капиллярными сосудами.

производителей японских журавлей Питомника для инкубации и выращивания птенцов с последующим их выпуском в природу на территории Амурской области – в пределах естественного гнездового ареала данного вида. Японский журавль и стерх – наиболее редкие в России виды журавлей, занесенные в Красную книгу Российской Федерации (I категория статуса) и Красный список Международного союза охраны птиц. Журавль-красавка и серый журавль – самые распространенные в России виды журавлей, однако охраняемые на региональном уровне в связи с угрозами местам их обитаний и, как следствие, сокращающейся численностью.

Выделение ДНК из препарированных капилляров аллантоиса проводили с помощью ионообменной смолы Chelex100 (Walsh et al., 1991). В качестве маркера пола использовали последовательность EE0.6, амплифицированную с помощью комбинации праймеров A (AWS05/NRD4: 5'-CACCCTGGATTGGACAACCTATTTC-3'; 5'-TCAGAGCACTCTTTCCAGGAA-3') и B (SINT-F/SINT-R: 5'-TAGGCTGCAGAATACAGCAT-3'; 5'-TTGTGCAGTTCTAGTCCATA-3'), адаптированную для журавлей (Bao et al., 2009a; 2009b) и протестированную нами ранее на разных видах журавлей с известным полом (Мудрик и др., 2011; Мудрик и др., 2013). Условия ПЦР были следующими: первичная денатурация при 94°C – 5 мин, далее 30 циклов, включающих денатурацию при 94°C – 50 с, отжиг праймеров при 57°C – 50 с, элонгацию при 72°C – 50 с, и завершающая элонгация при 72°C – 10 мин. Электрофорез ПЦР-продуктов проводили в 1.5% агарозном геле (буферная система TAE) при напряжении 120 В с последующим окрашиванием геля бромистым этидием и визуализацией ампликонов в ультрафиолетовом

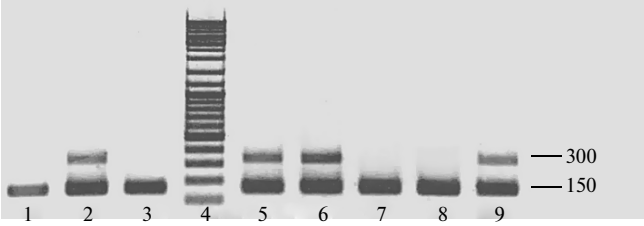

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации маркера пола EE0.6 (AB) у птенцов журавлей, родившихся в 2012 г. Порядок образцов: 1–3 – стерх; 4 – маркер длин фрагментов; 5, 6 – японский журавль, 7 – журавль-красавка; 8, 9 – серый журавль. Пол птенцов: 1, 3, 7, 8 – самцы, 2, 5, 6, 9 – самки. Числами обозначены размеры фрагментов в парах нуклеотидов.

свете с помощью системы гель-документации Kodak Edas 290.

Как и ожидалось, у птенцов всех четырех видов журавлей электрофоретический спектр EE0.6 самцов был представлен одним вариантом с молекулярным весом 150 пар нуклеотидов (п.н.), “женский” спектр – двумя полосами, 150 и 300 п.н. (рис. 2). В таблице приведены результаты определения пола птенцов по годам. Так, за три года среди 26 стерхов идентифицировано поровну самок и самцов, среди 15 японских журавлей за четыре года – восемь самцов и семь самок, из четырех серых журавлей за три года – три самки и один самец, один птенец красавки, родившийся в 2012 г., оказался самцом. В целом за четыре года среди 44 птенцов четырех видов 23 были идентифицированы как самцы и 21 – как самки.

Таким образом, мы продемонстрировали, что неинвазивный метод идентификации пола птенцов по ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантоиса, позволяет определять пол журавлят сразу после их вылупления. Кроме того, данный метод может использоваться при ретроспективном установлении пола птиц, реинтродуцированных в природу, но после которых сохранилась скорлупа с подскорлуповыми оболочками.

Можно отметить также, что примененный нами ДНК-маркер пола EE0.6 эффективен не только в отношении видов журавлей, включенных в данную работу, но и для таких видов как черношейный (*G. nigricollis* Przewalski) (Bao et al., 2009b), даурский (*Grus vipio* Pallas) и черный (*G. monacha*

Результаты молекулярного определения пола у птенцов четырех видов журавлей в период 2009–2012 гг. с использованием ДНК, выделенной из капиллярных сосудов аллантоиса после вылупления птенцов

Вид журавлей	Год рождения	Количество птенцов	Самцы	Самки
Стерх	2010	8	4	4
	2011	6	4	2
	2012	12	5	7
		26	**13**	**13**
Японский журавль	2009–2010	9	5	4
	2011	4	3	1
	2012	2	0	2
		15	**8**	**7**
Серый журавль	2010	1	0	1
	2011	1	0	1
	2012	2	1	1
		4	**1**	**3**
Журавль-красавка	2012	1	1	0
		44	**23**	**21**

Temminck) журавли (Bao et al., 2009b; Мудрик и др., 2013), а также впервые протестированные нами канадский (*G. canadensis* L.), индийский (*G. antigone* L.), восточный (*Balearica regulorum* Bennett) и западный (*B. pavonia* L.) венценосные журавли (Мудрик и др., 2013). Описанный неинвазивный метод позволяет определять пол птенцов и устанавливать соотношение полов не только у птиц, разводимых в искусственных условиях, но и у журавлей из природных популяций, при исследовании которых подскорлуповые оболочки являются более доступным материалом, чем кровь или свежие перья.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа поддержана программами фундаментальных исследований Президиума РАН “Биологическое разнообразие” (подпрограмма “Генофонды и генетическое разнообразие”, 2010–2011 гг.) и “Живая природа” (подпрограмма “Динамика и сохранение генофондов”, 2012 г.), а также Евроазиатской региональной ассоциацией зоопарков и аквариумов (ЕАРАЗА) в рамках программы “Сохранение журавлей Евразии” (2012 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Брагина Е.В., Бёме И.Р. Половые и индивидуальные различия в вокальном репертуаре взрослых стерхов (*Grus leucogeranus,* Gruidae) // Зоологический журнал. 2007. Т. 86. № 12. С. 1468–1481.

Гилберт С. Биология развития. М.: Мир, 1993. 228 с.

Кленова А.В., Володин И.А., Володина Е.В., Кашенцева Т.А. Половые различия в свистовых звуках при дискомфорте у птенцов японского журавля // Орнитология. 2005. Т. 32. С. 105–111.

Кленова А.В., Володин И.А., Володина Е.В., Кашенцева Т.А. Соотношение индивидуальных, половых и родственных различий в свистовых звуках птенцов японского журавля (*Grus japonensis*) в онтогенезе // Зоологический журнал. 2008. Т. 87. № 4. С. 458–465.

Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. Определение пола у десяти видов журавлей с помощью ДНК-маркера EE0.6 // Генетика. 2013. (в печати).

Мудрик Е.А., Кашенцева Т.К., Политов Д.В. Определение пола журавлей с помощью сцепленных с полом ДНК-маркеров // Журавли Евразии (биология, распространение, миграция, управление). М., 2011. С. 126–127.

Флинт В.Е. Семейство журавлиные – Gruidae. Птицы СССР, Курообразные, журавлеобразные. Л.: 1987. 266–335 с.

Archibald G.W. The unison call of cranes as a useful taxonomic tool. Ithaca, 1976. 167 p.

Bao W.B., Musa H.H., Luan D.Q., Zhang H.X., Chen G.H. Molecular method of sex identification in Siberian white crane (*Grus leucogeranus*) // Journal of Applied Animal Research. 2009a. V. 35. № 2. P. 169–172.

Bao W.B., Wu S.L., Zhang H.X. Sex identification of seven species of cranes in China by PCR // Journal of Animal and Veterinary Advances. 2009b. V. 8. № 6. P. 1137–1140.

Bozkayaa F., Gürlera Ş., Yertürkb M., Aydılekc N. Isolation of DNA from embryo and chorio-allantoic membranes and sexing by PCR in Japanese quail // British Poultry Science. 2013. V. 54. № 1. P. 106–111.

Carlson G., Trost C.H. Sex determination of the Whooping Crane by analysis of vocalizations // Condor. 1992. V. 94. № 532–536.

Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of nonratite birds // Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 1996. V. 263. № 1377. P. 1635–1641.

Griffiths R., Daan S., Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes // Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences. 1996. V. 263. № 1374. P. 1251–1256.

Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J.G. A DNA test to sex most birds // Molecular Ecology. 1998. V. 7. № 8. P. 1071–1075.

Itoh Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K., Mizuno S. Identification of the sex of a wide range of carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences // Journal of Heredity. 2001. V. 92. № 4. P. 315–321.

Meine C.D., Archibald G.W. The cranes: Status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland, and Cambridge, UK, 1996. 294 p.

Ogawa A., Solovei I., Hutchison N., Saitoh Y., Ikeda J., Macgregor H., Mizuno S. Molecular characterization and cytological mapping of a nonrepetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds // Chromosome Res. 1997. V. 5. P. 93–101.

Swengel S.R. Sex determination // Crane: Their Biology, Husbandry, and Conservation (ed. by D.H. Ellis). Washington, 1996. P. 223–231.

Turkyilmaz M.K., Karagenc, L., Fidan, E. Sexing of newly-hatched chicks using DNA isolated from chorio-allantoic membrane samples by polymerase chain reaction in Denizli chicken // British Poultry Science. 2010. V. 51. № 4. P. 525–529.

Walkinshaw L.H. Cranes of the world. New York: Winchester Press, 1973. 370 p.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR based typing from forensic material // Biotechniques. 1991. V. 10. № 4. P. 506–513.

Non-Invasive Method of Sex Identification of Crane Chicks by the DNA from Capillary Vessels of Allantois

E. A. Mudrik[a], T. A. Kashentseva[b], E. A. Gamburg[a], E. Yu. Gavrikova[c], and D. V. Politov[a]

[a] *Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia*

[b] *Crane Breeding Centre, Oka State Nature Reserve, Brykin Bor, Spassk district, Ryazan oblast, 391072 Russia*

[c] *Reintroduction Station of Rear Birds, Khinganskii State Nature Reserve, Arkhara, Amur oblast, 675740 Russia*

e-mail: mudrik@vigg.ru

Received February 27, 2013; in final form, April 11, 2013

Abstract—The non-invasive method of determining the sex of chicks after hatching based on the DNA isolated from capillary vessels of allantois of the egg-shell membranes was demonstrated on four crane species (Gruinae, Aves), which were bred in the Crane Breeding Centre of the Oka Nature Reserve in 2009–2012. Using the EE0.6 molecular marker of sex, the gender of 26 Siberian (*Grus leucogeranus*), 15 Red-crowned (*G. japonensis*), 4 Common (*G. grus*) and 1 Demoiselle (*Anthropoides virgo*) crane chicks was identified. This method can be recommended for determining the sex of chicks and the ratio of sexes in cranes that reproduce both in captivity and natural populations.

Keywords: cranes, sex identification, allantois, egg-shell membrane, DNA, non-invasive molecular methods