

УДК 575.174.4:598.241.2

ДЛИТЕЛЬНОЕ СОХРАНЕНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ У СТЕРХА (*GRUS LEUCOGERANUS* PALLAS): АНАЛИЗ ОТЦОВСТВА И РОДСТВА ПРИ ИСКУССТВЕННОМ ОСЕМЕНЕНИИ

© 2016 г. Е. А. Мудрик*, Т. А. Кашенцева**, Д. В. Политов*

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
119991 Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3

**Питомник редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника
391072 Рязанская обл., Спасский р-он, п. Брыкин Бор

E-mail: mudrik@vigg.ru

Поступила в редакцию 14.04.2015 г.

Окончательный вариант получен 20.11.2015 г.

С использованием 10 микросателлитных локусов проведен анализ отцовства у 71 особи стерхов (*Grus leucogeranus* Pallas), полученных в результате искусственного осеменения в Питомнике редких видов журавлей Окского заповедника в период 2001–2014 гг. Отцами 39 особей оказались самцы, чья сперма использовалась последней в серии осеменений, непосредственно перед откладкой оплодотворенного яйца. Отцовство 23 особей принадлежало самцам, чью сперму использовали в начале или середине серии осеменений. Девять случаев оплодотворения стали результатом естественного спаривания искусственно осеменяемых самок с их социальными партнерами. Сроки сохранения сперматозоидов в половых путях самок стерха составили 0–6 суток в случаях отцовства последних доноров спермы и 2–15 суток при оплодотворении конкурирующей спермой предшествующих доноров. Генетическое родство по микросателлитным локусам между производителями в искусственной популяции стерхов не препятствует оплодотворению и не всегда приводит к инбредной депрессии.

Ключевые слова: стерх, *Grus leucogeranus*, длительное сохранение сперматозоидов, искусственное осеменение, анализ отцовства, родство, микросателлитные локусы.

DOI: 10.7868/S0475145016030058

Длительное сохранение сперматозоидов в репродуктивных путях самки без потери фертильности (длительное переживание) обнаружено у многих видов позвоночных животных, в том числе у птиц (Максудов, 1996, 2006). Это явление, по всей видимости, связано с посткопулятивным половым отбором, проявляющимся в следующих формах: 1) конкуренции спермы разных самцов при многократном осеменении; 2) конкуренции между сперматозоидами одной особи и 3) скрытом выборе самкой предпочтительных для оплодотворения сперматозоидов (Birkhead, 1998; Birkhead, Pizzari, 2002; Evans et al., 2003; Alonzo, Pizzari, 2013). Механизмы полового отбора сложны и взаимосвязаны: конкуренция сперматозоидов контролируется самкой, организм которой abortирует нежелательные эмбрионы и способствует/препятствует оплодотворению яйцеклеток спермой генетически совместимых/несовместимых самцов (Zeh, Zeh, 1997; Tregenza, Wedell, 2000; Mays, Hill, 2004; Mays et al., 2008). Отбор данного типа может быть направлен как на отдельные гены, селективно важные в определенных условиях обитания, так и на повышение общей гетерозиготности потом-

ства, а также на элиминацию инбредных особей (Birkhead, Pizzari, 2002; Tregenza, Wedell, 2000, 2002; Foerster et al., 2003; Tarvin et al., 2005).

Скрещивания самки с разными самцами, способствующие улучшению генофонда потомства, свойственны не только полигамным, но и социально моногамным видам, к которым относятся и журавли. В природе известны случаи внесемейных спариваний канадского журавля (*Grus canadensis* L.), при этом внебрачным может быть не только отцовство, но и материнство (Haas et al., 2006, 2007). При разведении журавлей в неволе с применением метода искусственного осеменения способность журавлей к избирательному оплодотворению и длительному переживанию сперматозоидов была обнаружена, когда сроки между осеменениями самок и откладкой оплодотворенных яиц превышали 48 часов – время, требуемое для овуляции, оплодотворения и формирования яйца (Russman, 1985; Максудов и др. 1991; Максудов, 1996).

Длительное переживание сперматозоидов было отмечено у многих видов журавлей в неволе, включая редкого российского эндемика, сибирского журавля стерха (*Grus leucogeranus* Pallas). У

разных видов рода *Grus* этот период может достигать 6–9 суток (Russman, 1985; Jones, Nicolich, 2001; Максудов, 2006; Мудрик и др., 2011, 2014). Изучение данного явления в природе практически невозможно, поскольку для этого требуется не только наличие образцов ДНК от родителей и потомков, но и информация о датах спариваний и откладки яиц. Особенно затруднительным это представляется для редких видов. При изучении журавлей, размножаемых в неволе с помощью искусственного осеменения, для анализа доступны все необходимые сведения, так же как и биологические образцы от производителей и их потомков. При многократном искусственном осеменении самки спермой разных самцов вероятность оплодотворения увеличивается, однако отцовство птенцов и точные сроки сохранения сперматозоидов могут быть выявлены только молекулярно-генетическими методами.

Цель статьи – установление сроков длительного сохранения сперматозоидов в половых путях искусственно осеменяемых самок стерхов с помощью ДНК-анализа отцовства и выявление связи генетического родства размножаемых птиц с успешностью оплодотворения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализе были использованы биологические образцы от 71 особи стерха (65 птенцов и 6 эмбрионов), полученных в период 2001–2014 гг. в Питомнике редких видов журавлей Окского государственного природного биосферного заповедника (далее – Питомник) в результате размножения десяти самок методом искусственного осеменения. Шесть самок имеют природное происхождение и принадлежат к основателям искусственной популяции Питомника (номера в Международной племенной книге (МПК) стерха: 42, 68, 75, 97, 154, 219), по две самки относятся к первому F1 (МПК 89, 128) и второму F2 (МПК 226, 502) поколениям производителей (Kashentseva, Belterman, 2014). Для искусственного осеменения использовалась сперма девяти самцов: шести основателей (МПК 15, 33, 37, 67, 82, 85), двух производителей из поколения F1 (МПК 421, 505) и одного – из F2 (МПК 646).

Выделение ДНК у птенцов осуществляли с использованием ионообменной смолы Chelex100 (Walsh et al., 1990) и набора D1Atom™ DNA-Prep100 (ООО “Лаборатория Изоген”) из кровеносных сосудов аллантаоиса и растущих перьев, у взрослых птиц – из крови, взятой во время плановых диспансеризаций журавлей. Для анализа отцовства использовали 10 полиморфных микросателлитных локусов (*Gpa-12*, *Gpa-32*, *Gpa-38*, *Gpa-39*, *Gram-22*, *Gram-30*, *Gj-M8*, *Gj-M15*, *Gj-M34*, *Gj-2298*), отобранных ранее при изучении

генетической изменчивости в искусственной популяции стерха (Мудрик и др., 2011, 2014).

Показатели генетического родства (*R*) между размножающимися самками и самцами стерхов рассчитывали путем попарных сравнений частот аллелей микросателлитных локусов каждых двух сравниваемых особей относительно среднепопуляционных данных по методу Квеллера и Гуднайта (Queller, Goodnight, 1989) в надстройке для электронной таблицы MS Excel – GenAIEx 6.501 (Peakall, Smouse, 2012). Близкие к нулю значения *R* свидетельствуют об отсутствии генетического родства между сравниваемыми особями, полное генетическое сходство принимается за 1, родство между сибсами выражается как 0.5, между полусибсами – как 0.25 и т.д. (Queller, Goodnight, 1989). Корреляцию генетического родства самцов и самок с успешностью оплодотворения при искусственном осеменении рассчитывали в пакете статистического анализа STATISTICA (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Искусственное осеменение способствует повышению эффективности оплодотворения, поскольку его можно проводить многократно в течение сезона размножения, длящегося у журавлей с конца марта–начала апреля до середины мая. Осеменения самки спермой одного или разных самцов проводят последовательно с интервалом 2–3 дня, пока не получат нужное количество фертильных яиц, поскольку не каждое осеменение приводит к оплодотворению.

В основном искусственное осеменение применяется для вовлечения в репродукцию не спаривающихся самостоятельно птиц: импринтированных, травмированных, а также особей с неуживчивым характером. Импринтинг у журавлей происходит в результате ручного воспитания птенцов человеком, после чего выросшие птицы обоих полов не воспринимают особей своего вида в качестве партнеров для спаривания. Импринтированных самцов используют как доноров спермы для искусственного осеменения импринтированных самок, однако таких птиц объединяют в постоянные пары (журавли – строгие моногамы) так же, как и естественно размножающихся особей. Как и последние, импринтированные пары насиживают яйца и выращивают 1–2 птенцов, а дополнительные яйца инкубируются искусственно.

В таблице 1 приведен пример установления отцовства двух птенцов (МПК 930, 939), полученных в результате восьми осеменений самки МПК 502 в течение одного сезона размножения (2013 г.) спермой трех самцов (МПК 82, 421, 15), с определением сроков сохранения сперматозоидов до оплодотворения. Анализ микросателлитных локусов всех участников размножения показал, что

Таблица 1. Пример установления отцовства по микросателлитным локусам у двух птенцов стерха, полученных в результате искусственного осеменения самки спермой трех самцов, с демонстрацией длительного сохранения сперматозоидов в половых путях самки до оплодотворения яйцеклетки в течение четырех (а) и 15–18 (б) суток*

Особь	МПК	Дата		Микросателлитные локусы													
		осемене- ния самки	откладки яйца	<i>Gram22</i>		<i>Gram30</i>		<i>Gpa12</i>		<i>Gpa38</i>		<i>Gpa39</i>		<i>GjM15</i>		<i>Gj2298</i>	
Самка	502			160	168	194	202	210	214	178	178	102	120	100	110	145	151
Самец (отец)	82	10.04.2013		160	160	186	202	206	210	178	182	86	120	104	110	145	172
Самец	421	13.04.2013		168	172	194	198	206	214	178	178	102	104	100	104	151	160
<i>а</i> Птенец	930		16.04.2013	160	160	202	202	206	210	178	182	120	120	104	110	151	172
Самец (отец)	15	16.04.2013		160	164	182	194	202	218	178	190	102	102	104	108	157	169
Самец	421	19.04.2013															
		26.04.2013		168	172	194	198	206	214	178	178	102	104	100	104	151	160
		01.05.2013															
		02.05.2013															
		05.05.2013															
<i>б</i> Птенец	939		06.05.2013	160	160	182	202	202	214	178	178	86	102	108	110	151	157

Примечание. МПК – Международная племенная книга стерха. Жирным шрифтом выделены аллели микросателлитных локусов, по которым исключается отцовство самца № 421 у обоих птенцов. * Продолжительность сохранения сперматозоидов в половых путях самки определяли по разнице между датами осеменения и откладки оплодотворенного яйца с вычетом двух суток, необходимых для формирования яйцевых оболочек после оплодотворения.

биологическими отцами обоих птенцов оказались самцы, сперма которых использовалась в начале серии осеменений, и которая конкурировала со спермой других доноров при последующих осеменениях. В случае с птенцом МПК 930 отцовство самца МПК 421 исключается по пяти микросателлитным локусам (*Gram-22*, *Gram-30*, *Gpa-38*, *Gpa-39*, *Gj-2298*), в случае с птенцом МПК 939 отцовство этого же самца опровергается по шести локусам (*Gram-22*, *Gram-30*, *Gpa-12*, *Gpa-39*, *Gj-M15*, *Gj-2298*). Таким образом, яйцо, из которого вылупился первый птенец, было отложено 16 апреля, через шесть суток после осеменения самки (10.04.) спермой его отца МПК 82. Яйцо со вторым птенцом было отложено 6 мая, через 17 или 20 суток после соответствующих осеменений (16.04. и 19.04.) спермой самца МПК 15. После вычета двух суток, требуемых для формирования яйцевых оболочек после оплодотворения яйцеклетки, оказалось, что продолжительность сохранения фертильности и конкурентоспособности сперматозоидов самца МПК 82 составила четверо суток, у самца МПК 15 этот срок оказался 15 или 18 суток (см. табл. 1). Это большой для журавлей период переживания спермы в половых путях самки: максимально известный ранее срок (16 суток) отмечен у сережчатого журавля (*Bugeranus carunculatus* Gmelin) (Swengel, Tuite, 1997, цит. по Jones, Nicolich, 2001). Интересно отметить, что пять осеменений самки спермой самца МПК 421 не при-

вели к оплодотворению, тогда как ошибочное осеменение данной самки спермой ее отца МПК 82 было эффективным даже в условиях конкуренции (см. табл. 1). Однако птенец от этого близкородственного скрещивания,отягощенный последствиями инбридинга, оказался нежизнеспособным из-за врожденных аномалий нижних конечностей и умер в возрасте 17 дней.

Всего в результате анализа отцовства 71 потомка стерхов было показано, что в 39 случаях оплодотворение произошло спермой последнего донора через 0–6 суток после осеменения (табл. 2). В половине этих случаев, когда осеменения проводились последовательно спермой одного и того же самца, точная дата оплодотворения нам не известна, потому в таблице 2 приведены минимальные сроки переживания сперматозоидов, хотя они могут быть и больше. В 23 случаях оплодотворение произошло в условиях конкуренции спермы от разных самцов через 2–15 (а возможно, и 18) суток после осеменения. В девяти случаях оплодотворения отцовство принадлежало трем импринтированным и одному травмированному самцу в результате естественной копуляции, несмотря на искусственное осеменение их социальными партнерами спермой других доноров. Самостоятельная копуляция импринтированных самцов – редкое явление, ранее считавшееся невозможным. Самцы журавлей с травмированными или больными конечностями также практически не спо-

Таблица 2. Сроки сохранения сперматозоидов в половых путях самок стерха и количество случаев оплодотворения по результатам анализа отцовства

Сроки (сутки)	Количество оплодотворений		
	спермой последнего донора	конкурирующей спермой	в результате естественной копуляции
0+*	10	—	Нет данных
1	2	—	»
1+	8	—	»
3	2	3	»
2+	9	—	»
3	5	7	»
3+	—	2	»
4	1	3	»
4+	—	3	»
5	—	1	»
6+	2	—	»
7	—	1	»
8	—	1	»
9+	—	1	»
15+	—	1	»
Всего	39	23	9

* Знак “+” указывает на то, что срок сохранения сперматозоидов может быть равным или превышать указанное количество суток в случаях, когда осеменение спермой одного и того же самца с установленным отцовством проводилось неоднократно с интервалом в 2–3 дня до откладки оплодотворенного яйца.

собны спариваться из-за трудностей взлета на самку и удерживания баланса во время копуляции. Однако самец МПК 73, страдавший артрозом пяточных суставов, спаривался со своей самкой два года подряд, в результате чего было получено четыре оплодотворенных яйца (Mudrik et al., 2014), а из девяти импринтированных самцов-производителей Питомника трое (МПК 37, 421, 646) оказались способны к естественному размножению.

Всего в результате 264 искусственных осеменений произошло 62 оплодотворения, не считая девять эпизодов с естественным спариванием (табл. 3). Следовательно, одно оплодотворение явилось итогом в среднем 4.25 осеменений. Анализ генетического родства R между производителями показал, что оплодотворение происходило при любой степени родства, вплоть до сибсов и прямых родственников по вертикальной линии. В таблице 3 приведены значения R , количество осеменений и оплодотворений только для пар производителей, которые были задействованы в искусственном осеменении. Оказалось, что в 2/3 случаев осеменений с несостоявшимся оплодотворением участвовали генетически неродственные птицы, и только в 1/3 – родственные. При этом оплодотворение происходило в большом диапазоне значений данного показателя: от

минимального отрицательного между самкой и самцом природного происхождения (МПК 42 и 37; $R = -0.494$) до максимального положительного между сибсами (МПК 502 и 646; $R = 0.394$). Самостоятельное размножение импринтированных сибсов, непреднамеренным образом сформировавших пару, нуждается в отдельном исследовании, поскольку их потомство не всегда обнаруживало признаки инбредной депрессии. Так, в результате двух случаев естественного оплодотворения у этой пары, один эмбрион замер на раннем этапе развития, тогда как из другого развился здоровый птенец, впоследствии реинтродуцированный в природу. Значения попарных показателей генетического родства между самцами и самками стерхов не коррелировали с успешностью оплодотворения при искусственном осеменении, выраженной как отношение числа полученных потомков к числу осеменений (коэффициент Пирсона $r = 0.0030$, $p = 0.983$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное сохранение сперматозоидов в половых путях самки у стерхов является распространенным явлением: у 52 из 62 особей, зачатых в результате искусственного осеменения, оплодотворение произошло как минимум через одни сутки

Таблица 3. Значения показателя генетического родства *R* между производителями стерхов Питомника (числитель) и количество осеменений/оплодотворений (знаменатель)

№ МПК	♂15	♂33	♂37	♂67	♂73†	♂82	♂85	♂421	♂505	♂646	Количество осеменений/оплодотворений
♀42	$\frac{-0.157}{1/1}$	$\frac{-0.305}{1/0}$	$\frac{-0.494}{20/6 + 1^*}$	$\frac{-0.391}{1/0}$	—	$\frac{-0.116}{9/1}$	$\frac{-0.076}{13/0}$	$\frac{0.184}{2/0}$	$\frac{-0.187}{2/1}$	$\frac{0.009}{3/0}$	52/9 + 1*
♀68	$\frac{-0.062}{6/1}$	$\frac{0.096}{26/5}$	—	—	—	$\frac{0.142}{1/0}$	—	$\frac{0.029}{3/1}$	—	$\frac{0.035}{6/3}$	41/10
♀75	$\frac{-0.071}{1/0}$	—	—	—	$\frac{-0.193}{0/4^*}$	—	$\frac{-0.289}{2/0}$	$\frac{0.261}{6/1}$	$\frac{0.365}{1/0}$	$\frac{0.144}{3/0}$	13/1 + 4*
♀89	—	—	—	—	—	$\frac{-0.273}{9/2}$	$\frac{-0.116}{1/0}$	—	—	—	10/2
♀97	—	—	—	$\frac{0.146}{1/1}$	—	—	$\frac{0.076}{49/9}$	$\frac{-0.440}{2/1}$	—	—	52/11
♀128	—	—	—	—	—	$\frac{-0.320}{15/6}$	—	—	$\frac{0.095}{1/0}$	$\frac{0.235}{1/0}$	17/6
♀154	$\frac{0.209}{1/0}$	—	—	$\frac{-0.196}{10/3}$	—	$\frac{-0.099}{2/1}$	$\frac{0.048}{7/3}$	$\frac{-0.160}{5/0}$	$\frac{-0.169}{1/1}$	$\frac{0.127}{1/1}$	27/9
♀219	$\frac{0.049}{13/4}$	$\frac{-0.141}{5/1}$	$\frac{-0.406}{1/1}$	—	—	$\frac{-0.208}{2/0}$	$\frac{-0.101}{2/0}$	—	—	$\frac{-0.107}{3/1}$	26/7
♀226	—	$\frac{-0.054}{2/0}$	—	$\frac{-0.110}{1/0}$	—	—	$\frac{0.097}{6/4}$	$\frac{-0.212}{0/2^*}$	$\frac{-0.221}{1/0}$	—	12/4 + 2*
♀502	$\frac{0.039}{5/2}$	$\frac{-0.375}{1/0}$	—	—	—	$\frac{0.304}{1/1}$	—	$\frac{0.333}{7/0}$	—	$\frac{0.394}{0/2^*}$	14/3 + 2*
Количество осеменений/оплодотворений	26/8	35/6	21/7 + 1*	13/4	0/4*	39/11	80/16	27/3 + 2*	6/2	17/5 + 2*	264/62 + 9*

Примечание. * — оплодотворения произошли в результате естественного спаривания и поэтому они не суммируются с оплодотворениями в результате искусственных осеменений; † — самец, не участвовавший в искусственном осеменении. Через дробь указано количество осеменений, проведенных самке спермой конкретного самца, и оплодотворений с установленным отцовством.

после осеменения. Даже при отсутствии конкурирующей спермы других самцов, сперматозоиды сохранялись в половых путях самки перед оплодотворением до шести суток. В условиях конкуренции спермы от разных доноров время переживания сперматозоидов достигало максимальных для журавлей сроков 15–18 суток. Поскольку не каждое искусственное осеменение приводит к оплодотворению, можно предположить, что и не каждая популяция этому способствует. Вероятно, накопление спермы в спермохранящих железах матковлагалищного соединения у самок, где сперматозоиды сохраняют свои оплодотворяющие свойства, увеличивает возможности скрытого выбора самкой наиболее оптимальных сперматозоидов для зачатия генетиче-

ски здорового потомства. Кроме того, длительное сохранение сперматозоидов в половых путях самки делает возможным формирование повторных кладок яиц без участия самцов.

Выявленное по микросателлитным локусам генетическое родство между производителями в искусственной популяции стерхов Питомника редких видов журавлей не препятствует оплодотворению и не всегда приводит к инбредной депрессии. Возможно, в предыдущих поколениях искусственно размножаемых стерхов генетический груз от близкородственных скрещиваний частично элиминировался. Вероятно также, что качество и конкурентоспособность сперматозоидов самцов, зависящие от состояния их здоровья и гормонального фона, имеют большее значение

для оплодотворения, нежели отбор против инбридного потомства.

Для продолжения выяснения генетической компоненты полового отбора при искусственном осеменении и естественном размножении стерхов в дальнейшем целесообразно провести анализ родства производителей по генам главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) – системе маркеров, определяющих иммунитет организма. В отличие от рыб и млекопитающих, для которых показан скрытый выбор самки в пользу самцов, гетерогенных по ГКГ, роль этих генов для полового отбора у птиц не очевидна. Кроме того, селективные эффекты по генам ГКГ при естественном спаривании не наблюдались при искусственном осеменении у некоторых видов птиц (Lovlie et al., 2013), что свидетельствует о сложных механизмах полового отбора у этих организмов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1900.2014.4, программ 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 “Сохранение журавлей Евразии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Максудов Г.Ю. Длительное переживание сперматозоидов в половых путях самок позвоночных: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1996. 24 с.
- Максудов Г.Ю. Экологические аспекты длительного переживания сперматозоидов в половых путях самок журавлей // Журавли Евразии (биология, охрана, разведение). 2006. Вып. 2. С. 57–60.
- Максудов Г.Ю., Маркина Т.А., Панченко В.Г. Переживание спермы у самки канадского журавля // Орнитология. 1991. Т. 25. С. 198–200.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Гамбург Е.А., Политов Д.В. Генетическая паспортизация и идентификация стерхов (*Grus leucogeranus* Pallas) в искусственно созданных условиях // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. № 3. С. 219–227.
- Мудрик Е.А., Кашенцева Т.А., Политов Д.В. Генетическое разнообразие и мультилокусное генотипирование стерха по микросателлитным локусам // Журавли Евразии (биология, распространение, миграция, управление). 2011. Вып. 4. С. 81–87.
- Birkhead T.R. Cryptic female choice: Criteria for establishing female sperm choice // *Evolution*. 1998. V. 52. № 4. P. 1212–1218.
- Birkhead T.R., Pizzari T. Postcopulatory sexual selection // *Nature Reviews Genetics*. 2002. V. 3. № 4. P. 262–273.
- Evans J.P., Zane L., Francescato S., Pilastro A. Directional postcopulatory sexual selection revealed by artificial insemination // *Nature*. 2003. V. 421. № 6921. P. 360–363.
- Foerster K., Delhey K., Johnsen A. et al. Females increase offspring heterozygosity and fitness through extra-pair matings // *Nature*. 2003. V. 425. № 6959. P. 714–717.
- Hayes M.A. Observation of an extra-pair copulation by Sandhill Cranes // *Wilson J. Ornith.* 2007. V. 119. № 1. P. 113–116.
- Hayes M.A., Britten H.B., Barzen J.A. Extra-pair fertilizations in Sandhill Cranes revealed using microsatellite DNA markers // *Condor*. 2006. V. 108. № 4. P. 970–976.
- Jones K.L., Nicolich J.M. Artificial insemination in captive whooping cranes: Results from genetic analyses // *Zoo Biol.* 2001. № 20. P. 331–342.
- Kashentseva T.A., Belterman R. Siberian Crane – *Grus leucogeranus* International Studbook. Oka State Biosphere Nature Reserve, 2014. 184 p.
- Lovlie H., Gillingham M.A.F., Worley K. et al. Cryptic female choice favours sperm from major histocompatibility complex-dissimilar males // *Proc. R. Soc. B*. 2013. V. 280. № 1769. P. 1–9.
- Mays H.L., Hill G.E. Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit // *Trends Ecol. Evol.* 2004. V. 19. № 10. P. 554–559.
- Mays H.L., Albrecht T., Liu M., Hill G.E. Female choice for genetic complementarity in birds: a review // *Genetica*. 2008. V. 134. № 1. P. 147–158.
- Mudrik E.A., Kashentseva T.A., Politov D.V. DNA analysis proved paternity of ‘husbands’ in artificially bred Siberian cranes // *Siberian Crane Flyway News*. 2014. № 13. P. 21–22.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // *Bioinformatics*. 2012. № 28. P. 2537–2539.
- Russman S.I. Timing insemination to maximize fertility in cranes // *Proc. Crane Workshop / Ed. Lewis J.C. Grand Island, Nebr.* 1985. P. 398–405.
- Queller D.C., Goodnight K.F. Estimating relatedness using genetic markers // *Evolution*. 1989. V. 43. № 2. P. 258–275.
- Swengel S.R., Tuite M.L. Recent advances in scheduling strategies and practical techniques in crane artificial insemination // *Proc. North Am. Crane Workshop*. 1997. № 7. P. 46–55.
- Tarvin K.A., Webster M.S., Tuttle E.M., Pruett-Jones S. Genetic similarity of social mates predicts the level of extra-pair paternity in splendid fairy-wrens // *Anim. Behav.* 2005. № 70. P. 945–955.
- Tregenza T., Wedell N. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: Invited review // *Mol. Ecol.* 2000. V. 9. № 8. P. 1013–1027.
- Tregenza T., Wedell N. Polyandrous females avoid costs of inbreeding // *Nature*. 2002. V. 415. № 6867. P. 71–73.
- 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.
- Zeh J.A., Zeh D.W. The evolution of polyandry II: postcopulatory defences against genetic incompatibility // *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1997. V. 264. № 1378. P. 69–75.

Long Sperm Storage in the Siberian Crane (*Grus leucogeranus* Pallas): Analysis of Paternity and Relatedness under Artificial Insemination

E. A. Mudrik¹, T. A. Kashentseva², and D. V. Politov¹

¹*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science
119991 Moscow, GSP-1, 3 Gubkin Str.*

²*Oka Crane Breeding Center, Oka State Nature Biosphere Reserve
391072, Ryazan oblast, Spassky r-on, pos. Brykin Bor
e-mail: mudrik@vigg.ru*

Received April 14, 2015; in final form, November 20, 2015

Using 10 microsatellite loci, paternity analysis have been conducted for 71 individuals of the Siberian crane (*Grus leucogeranus* Pallas) obtained under artificial insemination in Oka Crane Breeding Center during 2001–2014 years. The fathers of 39 offspring turned out the sires whose sperm was used for insemination directly before fertilized egg laying. Paternity of 23 fertilizations belonged to sires whose sperm was used in the beginning or middle of insemination cycle. Nine cases of fertilization resulted from natural copulation of artificially inseminated females with their social partners. Terms of sperm storage in the female's reproductive ducts before fertilization were 0–6 days in case of paternity of the last sperm donor and 2–15 days in case of competing sperm by previous donors. Genetic relatedness by microsatellite loci between breeders of the captive Siberian crane population does not prevent fertilization between and not always leads to inbreeding depression.

Keywords: Siberian crane, *Grus leucogeranus*, long sperm storage, artificial insemination, paternity analysis, relatedness, microsatellite loci