

Molecular Sexing and Other PCR Routines in Raptors Research**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА И ДРУГИЕ РУТИННЫЕ ПЦР-АНАЛИЗЫ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ХИЩНЫХ ПТИЦ***Zinevich L.S., Rozhkova D.N. (Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia)**Nikolenko E.G., Shnayder E.P., Karyakin I.V. (Sibecocenter LLC, Novosibirsk, Russia)**Зиневич Л.С., Рожкова Д.Н. (ИБР РАН, Москва, Россия)**Николенко Э.Г., Шнайдер Е.П., Карякин И. В. (ООО «Сибэкоцентр», Новосибирск, Россия)***Контакт:**Людмила С. Зиневич
lzinevich@gmail.comДарья Н. Рожкова
darroznature@gmail.comЭльвира Г. Николенко
elnik2007@ya.ruЕлена П. Шнайдер
equ001@gmail.comИгорь В. Карякин
ikar_research@mail.ru**Contact:**Ludmila S. Zinevich
lzinevich@gmail.comDarja N. Rozhkova
darroznature@gmail.comElvira G. Nikolenko
elnik2007@ya.ruElena P. Shnayder
equ001@gmail.comIgor Karyakin
ikar_research@mail.ru

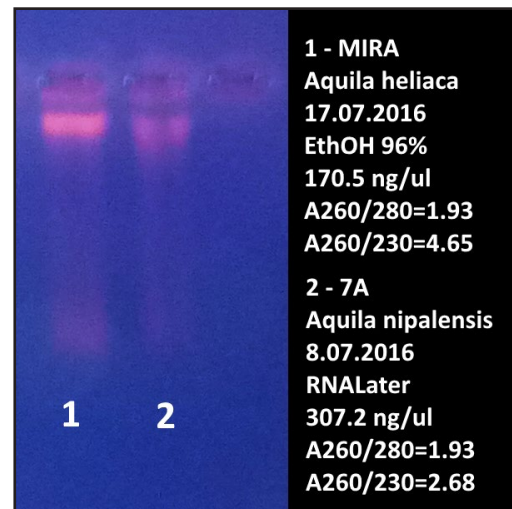
Вручение Нобелевской премии за открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР) было связано, в первую очередь, с прорывом в области генетических исследований и медицинской диагностики, однако применение методов молекулярного анализа значительно расширило также возможности для полевых исследователей. В первую очередь, с изобретением ПЦР произошла смена парадигмы в систематике в сторону оценки, в первую очередь, генетических дистанций и лишь затем – описания морфологических и экологических маркеров для различных таксонов. В связи с этим проявились проблемы, связанные с несовершенством молекулярно-генетических методов (Коблик и др., 2018), однако развитие методической базы и оборудования позволяет надеяться, что противоречия между классической и молекулярной систематикой в скором времени будут сняты. Кроме задач классификации и описания, молекулярно-генетические методы могут быть полезны зоологам и экологам в решении множества разнообразных исследовательских задач. В данной работе мы постарались обобщить опыт применения ПЦР и секвенирования по Сэнгеру в рутинных исследованиях, которые ведутся с 2015 г. на базе ИБР РАН при пополнении и использовании Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц ИБР РАН и ООО «Сибэкоцентр». Для выделения ДНК хищных птиц мы используем кровь, заспиртованные ткани и перьевые трубки растущих перьев, мезенхимную пульпу линных перьев (Horvath et al., 2005). При выделении ДНК из перьевых трубок растущих перьев можно получить образцы ДНК хорошего качества с содержанием не менее 150 нг/мкл (рис. 1), что достаточно для любого анализа, в том числе, для полногеномных исследований. ДНК в мезенхимной пульпе линных перьев сильно фрагментирована

The Nobel prize for PCR invention was awarded firstly because of the advances for genetics and diagnostics. But molecular genetic methods provide also powerful capabilities for field studies. Primarily, the PCR invention gave rise to the paradigm shift in systematics: from morphological traits characterization to estimation of genetic distances to segregate taxons. Imperfection of molecular methods now leads to some problems (Koblik et al., 2018), but rapid evolvement of the procedural framework and equipment holds out a hope of resolution of known contradictions between classic and molecular systematics in a short time. For another thing, molecular genetic methods may be helpful to zoologists and ecologists in solution of many different research tasks. Here we tried to summarize the experience in using PCR and Sanger sequencing for routine studies conducted during our work with the Collection of raptors molted feathers of IDB RAS and Sibecocenter LLC. We perform DNA extraction from blood, tissues and growing contour feathers preserved in alcohol as well as from mesenchyme pulp of molted feathers (Horvath et al., 2005). DNA extraction from growing contour feathers with sheath gives high-quality DNA samples with concentration upwards of 150 ug/ul (fig. 1). That is enough for any analyses including full-genome studies. DNA extracted from the molted feathers is highly fragmented because of dryness of the mesenchyme pulp, UV-radiation and other agents. What is more, it is contaminated with bacterial DNA and DNA of mold fungi, firstly, of genus *Aspergillus*, which are avian obligative parasites. According to our records, DNA samples from molted feathers allow to perform PCR of products up to 400–500 bp in length (more than 90% of successful reactions), but even for 700 bp products the success is much smaller. That is only a little

Рис. 1. Выделение ДНК орлов из трубок растущих перьев при разном способе фиксации. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле, измерение концентрации и качества ДНК проведено с помощью спектрофотометра Nanodrop.

Fig. 1. Eagles DNA extraction from growing feathers with sheath fixed with different preserved agents. Horizontal agarose electrophoresis, Nanodrop measurements.

в результате высыхания крови в зрелом пере и впоследствии под воздействием УФ и других факторов. Кроме того, при выделении из линных перьев образец неизбежно содержит бактериальную ДНК и ДНК грибов, в первую очередь, рода *Aspergillus*, облигатных паразитов птиц. По нашим данным, на материале из линных перьев можно успешно проводить ПЦР фрагментов до 400–500 п.н. (более 90% образцов), но уже при использовании фрагмента 700 п.н. эффективность метода снижается. Несколько меньшая, но схожая эффективность выделения ДНК наблюдается при выделении ДНК из музейных шкурок хищных птиц, если образец ткани берётся с лапы или разреза, при возрасте сборов до 1889 г. включительно, однако в некоторых случаях обработка тушек в музее мешает проводить ПЦР-анализ. Методы выделения ДНК из подскорлуповых оболочек яиц и буккального эпителия в составе погадок хищных птиц в настоящее время находятся в разработке. Методы ПЦР и горизонтального электрофореза применяется нами, в первую очередь, для молекулярного подтверждения или определения пола птиц, помеченных в природе кольцами или GPS/GSM треккерами. За некоторыми исключениями, мы используем классическую методику определения пола с праймерами 2550F/2718R на интрон гена *CHD1*, расположенного в половых хромосомах (Fridolfsson, Ellegren, 1999). Эта методика прекрасно зарекомендовала себя для ДНК из любого источника нескольких видов орлов (степной *Aquila nipalensis*, орёл-могильник *A. heliaca*, беркут *A. chrysaetos*), чёрного грифа (*Aegypius monachus*). Для крупных соколов группы *Hierofalco* она может быть использована на образцах ДНК, полученных из крови или трубок растущих перьев, но не работает на линных перьях, как и другие универсальные праймеры P2/P8 (Griffiths et al., 1998). С помощью данной методики было установлено, что до 20% (37 образцов из 155) линных перьев степного орла, собранные с гнёзд, могут принадлежать самцам, а не самкам. Также этот метод был использован нами для разработки методики морфометрического

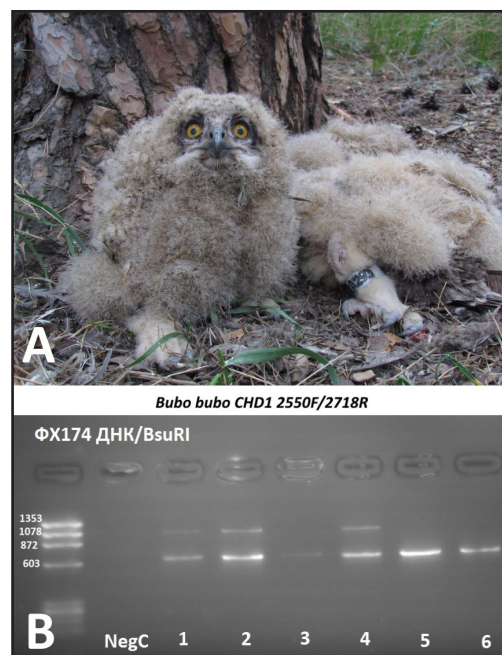


bit more effective than DNA extraction from raptors museum specimens through 1889 if the skin sample is taken from the leg or the edge of the cut. But sometimes the museum specimens are treated with some PCR inhibiting agents. DNA extraction protocols for eggs shell membranes, bones and buccal epithelium from saliva in rangles are now under construction. We use PCR and horizontal electrophoresis firstly for molecular sexing of ringed or GPS/GSM-tagged birds. Behind some exceptions, we apply the classic protocol using 2550F/2718R primers for sex chromosomes *CHD1* gene introns (Fridolfsson, Ellegren, 1999). This protocol showed good advantages for DNA samples of any source for eagles (Steppe Eagle *Aquila nipalensis*, Imperial Eagle *A. heliaca* or Golden Eagle *A. chrysaetos*) and Cinereous Vultures *Aegypius monachus*. For large falcons (*Hierofalco*), this protocol is applicable to DNA samples from blood and sheath of growing feathers, but does not work with samples from molted feathers as other universal primers for the same gene P2/P8 (Griffiths et al., 1998). The 2550F/2718R primers protocol allowed us to show, that up to 20% of the steppe eagle molted feathers in the nests can belong to males (37 samples from 155). This method was also used to develop the protocol of morphometric sexing of the Steppe Eagle nestlings by linear discriminant analysis of measurements based on molecular sexing results (Karyakin et al., 2017). As for owls (see fig. 2), 2550F/2718R primers can also be used: we determined the sex of six ringed nestlings of the Eagle Owl *Bubo bubo*. But due to the big length of the owlish W-chromosome fragment this protocol cannot be applied to molted feathers, rangles etc. Moreover, for owls the error prob-

Рис. 2. Определение пола птенцов филина (*Bubo bubo*) классическим методом по интронам гена *CHD1* (Fridolfsson, Ellegren, 1999). А – птенцы филина в возрасте, в котором был проведен анализ. В – результаты анализа методом ПЦР: образцы 1, 2, 4 – самки; 3, 5, 6 – самцы; NegC – отрицательный контроль.

Fig. 2. Molecular sexing of the Eagle Owl (*Bubo bubo*) nestlings with classic *CHD1* gene introns PCR protocol (Fridolfsson, Ellegren, 1999). А – the Eagle owl nestlings at the age of analysis. В – PCR results: samples 1, 2, 4 – females; 3, 5, 6 – males; NegC – negative control.

определения пола птенцов степного орла в природе путём проведения дискриминантного анализа по промерам в соответствии с молекулярными данными (Карякин и др., 2017). Что касается совообразных (см. рис. 2), праймеры 2550F/2718R также могут быть использованы (определён пол 6 окольцованных птенцов филина *Bubo bubo*), но в силу большего размера фрагмента с W-хромосомой у сов использовать эту методику для линных перьев и погадок невозможно, а во всех других случаях вероятность неверного определения также сильно повышается, в связи с чем, ранее было высказано предположение о невозможности определить, например, пол филина с помощью этой методики (Wang et al., 2008). В настоящее время мы разработали для филина тест-систему специфических праймеров на интроны гена *SPIN*, также расположенного в половых хромосомах, предварительно показавшую свою эффективность на ДНК из линных перьев. Кроме того, методы ПЦР и секвенирования по Сэнгеру на митохондриальные и ядерные маркеры позволили нам определить по линным перьям виды птиц, посещающих чужие гнёзда (чёрный гриф на гнезде степного орла), а также выявить предполагаемый гибрид степного орла и орла могильника, ранее не замеченный по фенотипическим признакам (Карякин и др., 2016).



ability is much higher than for diurnal raptors: there even was a hypothesis that Eagle Owls do not differ in the *CHD1* introns W- and Z-chromosomes length (Wang et al., 2008). Nowadays we are testing the newly-designed primers test system specific for the Eagle Owl *SPIN* gene introns, which are also located in sex chromosomes. Preliminary results show the capability of this primers set to perform the molecular sexing using DNA samples from molted feathers. Among other things, we used PCR and Sanger sequencing of mitochondrial and nuclear markers to determine raptors species visiting each other nests (the Cinereous Vulture feather in the Steppe Eagle nest) and to find out the Steppe Eagle and Imperial Eagle supposed hybrid which stayed unnoticed because of its low-grade phenotypic peculiarities (Karyakin et al., 2016).