

## НЕИНВАЗИВНАЯ ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМУРСКИХ ТИГРОВ (*PANTHERA TIGRIS ALTAICA*) МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

© 2009 г. В. В. Рожнов, П. А. Сорокин, С. В. Найденко, В. С. Лукаревский,  
Х. А. Эрнандес-Бланко, М. Н. Литвинов, А. К. Котляр, В. Г. Юдин

Представлено академиком Д.С. Павловым 15.07.2009 г.

Поступило 16.07.2009 г.

В рамках Программы изучения амурского тигра на Российском Дальнем Востоке отработана методика неинвазивной индивидуальной идентификации тигров молекулярно-генетическими методами и с ее использованием определены число, пол и родственные связи особей в группировке тигров на территории заповедника “Уссурийский” ДВО РАН. Сопоставление результатов выделения, амплификации и анализа ядерных фрагментов ДНК из различных образцов (кровь, шерсть и экскременты) показало значительное их сходство по длинам микросателлитных фрагментов ДНК. Это свидетельствует о возможности использования экскрементов и шерсти, собранных в местах обитания амурского тигра, для неинвазивной индивидуальной идентификации этих животных.

Амурский тигр (*P. tigris altaica*) имеет самый северный и географически удаленный от других материковых подвидов ареал. В результате этого он достаточно долгое время находится в изоляции [1]. Именно долгую изоляцию и катастрофическое падение численности под воздействием антропогенных факторов рассматривают в качестве причин очень низкого генетического разнообразия современной популяции амурского тигра. Анализ изменчивых фрагментов митохондриальной и микросателлитной ДНК выявил самую низкую из всех подвидов тигра изменчивость [2, 3].

При столь низком генетическом разнообразии и малой численности амурского тигра важно выяснить возможность использования молекулярно-генетических методов для неинвазивной ин-

дивидуальной идентификации этих хищников в природе. Экскременты, моча и волосы успешно используются в молекулярно-генетических исследованиях диких животных [4–6]. Присутствие в экскрементах хищных млекопитающих как собственной ДНК, так и ДНК их жертв, определяет специфику молекулярно-генетического анализа. Для определения ДНК исследуемого животного используется только колоректальная эпителиальная слизь, собираемая с поверхности помета [7].

Для отработки методов неинвазивной индивидуальной идентификации амурского тигра на Российском Дальнем Востоке были собраны кровь, шерсть и экскременты животных. Материал для анализа собирали в Зоологическом центре БПИ ДВО РАН (с. Гайворон, Спасский район, Приморский край), Зоосаде “Приамурский” им. В.П. Сысоева (Хабаровский край) и на территории Государственного природного заповедника “Уссурийский” им. В.Л. Комарова ДВО РАН. Образцы экскрементов и шерсти консервировали в 96%-ном этиловом спирте. Пробы крови собирали в пробирки с добавлением К3ЕДТА. Последующее выделение ДНК из экскрементов проводили с использованием набора QIAamp DNA Stool Mini Kit (“Qiagen”, США), а из крови и шерсти – набора QIAamp DNA Mini Kit (“Qiagen”, США). Для определения вида и пола использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с двумя парами праймеров ZFX-PF (5'-TACCGAGCGATATAGCTC-CAG-3') и ZFX-PR (5'-GTGTTCCTACGTAAAGC-TATTG-3') для X-хромосомы и DBY7-PF(5'-CTCAT-GAAGCCCTATTTTGGTTG-3') и DBY7-PR(5'-ACGGCGTCCGTATCTTCCA-3') для Y-хромосомы с последующей визуализацией в 3%-ном агарозном геле [8]. Для видовой идентификации на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 с использованием набора Big Dye (“Applied Biosystems”, США) определяли последовательность нуклеотидов фрагмента одной из половых хромосом. Для индивидуальной идентификации животных использовали 6 наиболее информативных микросателлитных локусов с праймерами, помеченными флуоресцентными красками (D10,

*Институт проблем экологии и эволюции  
им. А.Н. Северцова*

*Российской Академии наук, Москва*

*Государственный природный заповедник “Уссурийский”  
им. В.Л. Комарова Дальневосточного отделения*

*Российской Академии наук, Уссурийск*

*Биолого-почвенный институт*

*Дальневосточного отделения*

*Российской Академии наук, Владивосток*

**Таблица 1.** Характеристика животных и образцов, использованных для молекулярно-генетического анализа

Имя тигра	Происхождение	Кодовое обозначение животного и время после сбора до консервации	Пол	Тип анализируемого образца (кодированное обозначение)	Дата сбора образца
Нюрка	Зоологический центр БПИ ДВО РАН	tn	f	Кровь (b) Волосы (h) Экскременты (e)	29.04.08, 05.11.08
Кучер	Зоологический центр БПИ ДВО РАН	tk, tk (30 мин), tk (4 дня)	m	Кровь (b) Волосы (h) Экскременты (e)	29.04.08, 05.11.08
Алмаз (сын Кучера и Нюрки)	Зоологический центр БПИ ДВО РАН	tal	m	Кровь (b) Волосы (h) Экскременты (e)	29.04.08, 04.11.08
Аралия (дочь Кучера и Нюрки)	Зоосад “Приамурский” им. В.П. Сысоева (Хабаровский край)	ta	f	Кровь (b)	26.08.08
Воля	Зоосад “Приамурский” им. В.П. Сысоева (Хабаровский край) (поймана в природе в районе с. Инокентьевка, Хабаровский край)	tb	f	Кровь (b) Волосы (h)	26.08.08
Серьга	Заповедник “Уссурийский” ДВО РАН	t002	f	Кровь (b) Волосы (h) Экскременты (e)	01.11.08

Fca43, Fca304, E21B, 3ebf, e7) [9, 10]. Длины микросателлитных фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 с добавлением стандарта Liz 500 и программы GeneMapper v 4.0 (“Applied Biosystems”, США). Для повышения достоверности получаемых данных ПЦР с образцами ДНК из экскрементов проводили минимум 4 раза.

Получены наборы длин 6 микросателлитных локусов для трех особей амурского тигра из Зоологического центра БПИ ДВО РАН (образцы tn, tal, tk), двух особей из Зоосада “Приамурский” им. В.П. Сысоева (Хабаровский край) (образцы ta и tb) и одной особи из Заповедника “Уссурийский” ДВО РАН (образец t002), табл. 1.

По наборам длин полученных микросателлитных локусов оказалось возможным различать близких родственников (образцы tal, ta, tn, tk) (табл. 2).

Для отработки методов хранения проведен анализ образцов, собранных через разные промежутки времени после того, как тигры оставили экскременты. До консервации в этиловом спирте образцы находились в естественных погодных условиях (температура воздуха около 20°C). Анализ образцов от одной и той же особи, имеющих разный срок хранения до консервации (tk – 30 мин после сбора и tk2 – 4 дня после сбора), свидетельствует о том, что экскременты, собранные в течение 3–4 дней после дефекации, еще можно использовать для генотипирования. Однако при этом значительно возрастает риск потери инфор-

мации от отдельных микросателлитных локусов и половых хромосом. Так, для 7 образцов, собранных в Заповеднике “Уссурийский” ДВО РАН (табл. 3), по этой причине не удалось получить данных ни по одному микросателлитному локусу. Для остальных 28 образцов получена частичная информация (от 2 до 5 локусов), в большинстве случаев пригодная для индивидуальной идентификации животных (табл. 3).

Сопоставление результатов генотипирования различных образцов (кровь, волосы, экскременты) и результатов проведения нескольких ПЦР с использованием одной и той же ДНК (табл. 2–4) показало значительное их сходство.

Таким образом, отработанная методика позволяет осуществлять неинвазивную индивидуальную идентификацию амурских тигров по оставляемым ими экскрементам в естественных условиях.

В результате генотипирования 35 образцов экскрементов амурского тигра, собранных на территории Заповедника “Уссурийский” ДВО РАН при проведении полевых исследований, были определены число и пол особей, использующих территорию заповедника на протяжении года. Это взрослая самка тигра, помеченная в ходе отлова ошейником-передатчиком системы GPS Argos, и три ее детеныша, имеющих один из ее аллелей для каждого микросателлитного локуса. Кроме того, удалось генотипировать самца тигра, вероятного отца этих трех тигрят (отмечали на территории заповедника с весны 2008 г. до весны

**Таблица 2.** Длина аллелей (п.н.) микросателлитных локусов для разных типов образцов (b – кровь, h – волосы, e – экскременты) тигров из Зоологического центра БПИ ДВО РАН, Зоосада “Приамурский” им. В.П. Сысоева и Заповедника “Уссурийский” ДВО РАН (апрель 2008 – май 2009 гг.)

Образец	Локус, используемый праймер, краска								
	1, e7, tamra (желтая)			2, fca 304, rox (красная)			3, fca 43, fam (синяя)		
	b	h	e	b	h	e	b	h	e
tn	152/152	152/152	152/152	136/136	136/136	136/136	123/127	123/127	123/127
tn (повтор)	–	–	141/153	–	–	136/136	–	–	123/127
tal	152/156	152/156	153/157	136/136	136/136	136/136	127/127	127/127	127/127
tal (повтор)	152/156	*	152/156	136/136	*	136/136	*	–	127/127
tk	152/156	152/156	152/156	134/136	*	*	123/127	123/127	123/127
tk (повтор)	152/156	*	152/156	134/136	–	134/136	123/127	–	123/127
tk (30 мин)	–	–	152/156	–	–	134/134	–	–	123/127
tk2 (4дня)	–	–	156/156	–	–	*	–	–	123/127
t002	152/152	152/152	152/152	128/136	128/136	128/136	119/123	119/123	119/123
tb	152/152	152/152	–	128/136	128/136	–	123/123	123/123	–
ta	152/156	–	–	136/136	–	–	123/123	–	–

  

Образец	Локус, используемый праймер, краска								
	4, 3ebf, rgb (зеленая)			5, e21b, rgb (зеленая)			6, d10, tamra (зеленая)		
	b	h	e	b	h	e	b	h	e
tn	153/153	153/153	153/153	160/160	160/160	160/160	149/151	149/151	149/151
tn (повтор)	–	–	*	–	–	160/160	–	–	*
tal	153/153	153/153	153/153	160/160	–	–	151/151	151/151	151/151
tal (повтор)	*	–	153/153	–	–	160/160	151/151	–	151/151
tk	153/156	153/156	153/156	160/160	160/160	160/160	149/151	149/151	149/151
tk (повтор)	153/156	–	*	160/160	–	160/160	149/151	–	149/151
tk (30 мин)	–	–	*	–	–	160/160	–	–	*
tk2 (4дня)	–	–	*	–	–	160/160	–	–	*
t002	153/156	153/156	153/156	160/164	160/164	160/164	149/149	149/149	149/149
tb	153/156	*	–	162/162	162/162	–	149/149	149/149	–
ta	153/153	–	–	160/160	–	–	149/149	–	–

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4 звездочка – образцы, данные для которых получить не удалось из-за деградации ДНК, черточка – анализ не проводился.

2009 г.). Идентифицирован также один (возможно 2) тигр, не являющийся родственником упомянутых выше животных. Всего на территории заповедника в результате молекулярно-генетического анализа экскрементов амурского тигра идентифицировано 6–7 особей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности использования методов молекулярно-генетического анализа для неинвазивной индивидуальной идентификации особей амурского тигра по оставленным ими экскрементам. Однако из-за очень малого количества ядерной ДНК, получаемой из экскрементов, процессы выделения и проведе-

ния ПЦР в значительной степени приобретают вероятностный характер и иногда могут привести к ошибочным результатам. Для минимизации подобных ошибок необходимо обязательно проводить несколько повторений. Большое значение имеет также сохранность ДНК в собираемых пробах. Однозначный вывод о пригодности того или иного образца для анализа сделать трудно, но желательно использовать образцы не более чем 2–3-дневной давности. Кроме того, наши данные свидетельствуют об уникальной возможности использования молекулярно-генетических методов для определения отцовства и родственных отношений в естественных группировках амурских тигров.

**Таблица 3.** Длина аллелей (н.п.) микросателлитных локусов 1, 2, 3, 4, 5, 6 (объединенные данные по нескольким ПЦР) для тигров из заповедника “Уссурийский” ДВО РАН, полученных из анализа проб экскрементов

№ образца	Микросателлитные локусы						Половые хромосомы	Пол
	1	2	3	4	5	6		
4w	152/152	134/134	119/127	*	160/160	149/151	*	*
Pt1	152/152	*	123/127	*	*	*	150/200	m
Pt4	152/152	134/134	123/127	*	160/160	149/149	*	*
E004z	152/152	134/134	123/127	153/156	*	149/149	150/200	m
E057z	152/152	*	127/127	*	*	*	*	
E016z	152/152	*	123/127	*	*	*	150/200	m
E043l	152/152	134/134	153/156	*	*	149/149	150/200	m
E019n	152/152	134/134	123/127	153/156	160/160	*	150/200	m
T002	152/152	128/136	119/123	153/156	160/164	149/149	200/200	f
E008n	152/152	134/136	123/127	*	160/160	*	150/200	m
E009n	152/152	134/136	119/123	153/153	160/160	149/149	200/200	f
E011z	152/152	134/136	119/123	*	160/160	*	200/200	f
E021n	152/152	128/136	119/123	*	160/164	149/149	200/200	f
Teo4n	152/152	*	123/123	*	*	*	150/200	m
R003, E011n	*	*	*	*	*	*	200/200	f
E001h, t045l	*	*	*	*	*	*	*	*
E002n, E009z	*	*	*	*	*	*	150/0	m
E005h	*	*	*	*	*	*	150/200	m
E004z	152/152	134/134	123/127	153/156	*	149/149	150/200	m
E0157z	152/152	*	123/127	*	*	*	150/200	m
E016z	152/152	*	123/127	*	*	*	150/200	m
E043l	152/152	134/134	123/127	153/156	*	149/149	150/200	m
E001z	*	*	127/127	153/156	*	*	150/200	m
T038n	152/152	128/128	127/127	*	—	151/151	150/200	m
E32l	*	*	127/127	*	*	*	150/200	m
E032n	152/152	128/128	127/127	153/153	160/164	151/151	150/200	m
E005z	*	134/136	123/127	*	160/160	*	*	*
E071l	152/152	128/134	119/123	*	*	149/149	150/200	m
E017n	*	128/134	127/127	*	*	*	200/200	f
E010z	152/152	128/134	123/123	153/156	*	149/149	150/200	m
E014z	152/152	134/134	*	*	160/160	149/149	150/200	f
T012n	152/152	128/136	*	153/156	160/164	149/149	150/200	f

**Таблица 4.** Пол, определенный у 5 исследованных тигров для разных типов образцов

Кодовое обозначение животного	Пол	Образец			Пол животного, исходя из молекулярно-генетического анализа
		кровь	шерсть	экскременты	
tn	f	200	200	200	f
t002	f	200	200	200	f
tal	m	150/200	150/200	150/200	m
tb	f	200	200	—	f
tk	m	150/200	150/200	150/200	m

Полученные данные предполагается включить в общую генетическую базу данных по амурскому тигру, основанную на неинвазивных методах сбора материала с разных территорий.

Кроме решения экологических задач, применение данных методик анализа позволяет решать криминалистические и природоохранные вопросы, возникающие в отношении тигра – вида, занесенного в Красную книгу Российской Федерации. По запросу МВД России это было сделано нами, в частности, для выяснения как видовой принадлежности образцов, собранных в качестве улики, так и принадлежности разных образцов одному и тому же животному.

Авторы благодарят сотрудников Заповедника “Уссурийский” ДВО РАН и Зоосада “Приамурский” им. В.П. Сыроева за помощь при сборе материала для исследования.

Работа выполнена в рамках Программы изучения амурского тигра на Российском Дальнем Востоке при финансовой поддержке Международного благотворительного фонда “Константиновский”, ОАО Акционерной компании по транспорту нефти “Транснефть” и ОАО “Техснабэкспорт”.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kitchener A.C., Dugmore A.J.* // *Animal Conserv.* 2000. V. 3. P. 113–124.
2. *Luo S.-J., Kim J.-H., Johnson W.E. et al.* // *PLoS Biol.* 2004. V. 2. P. 2275–2293.
3. *Henry P., Miquelle D., Sugimoto T. et al.* // *Mol. Ecol.* 2009. P. 1–12.
4. *Murphy M.A., Kendall K.C., Robinson A., Waits L.W.* // *Conserv. Genet.* 2007. V. 8. P. 1219–1224.
5. *Ernest H.B., Boyce W.M., Bleich V.C.* // *Conserv. Genet.* 2003. V. 4. P. 353–366.
6. *Fernando P., Vidya T.N.C., Rajapakse C.* // *J. Heredity.* 2003. V. 94. № 2. P. 115–123.
7. *Wehausen J.D., Ramey H.R., Epps C.W.* // *J. Heredity.* 2004. V. 95. № 6. P. 503–509.
8. *Sugimoto T., Nagata J., Aramilev V.V. et al.* // *Conserv. Genet.* 2006. V. 7. P. 799–802.
9. *Bhagavatula J., Singh L.* // *BMC Genet.* 2006. V. 7. P. 48.
10. *Menotti-Raymond M., David V., Lyons L. et al.* // *Genomics.* 1999. V. 57. P. 9–23.