

УДК 599.742.21: 575.857: 57.088.7

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ СБОРА И КОНСЕРВАЦИИ НЕИНВАЗИВНЫХ ПРОБ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БУРОГО МЕДВЕДЯ (*URSUS ARCTOS* L.)

А. С. Кузнецова¹, К. Ф. Тирронен¹, Д. В. Панченко¹, Дж. Шрегель²,
Е. А. Хижкин¹

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

² Норвежский институт биоэкономических исследований, Сванвик, Норвегия

Показана возможность применения неинвазивного биологического материала в популяционно-генетических исследованиях крупных хищных млекопитающих на примере бурого медведя Кольско-Карельского региона. Сделана оценка эффективности методических приемов сбора и консервации проб. Материалом для исследования послужили 393 пробы экскрементов медведей, собранные на юге Мурманской области (Терский район) и в Республике Карелия. В лаборатории NIBIO Сванховд (Сванвик, Норвегия) выполнено выделение ДНК из образцов и проведено генетическое типирование по 8 микросателлитным локусам, в ходе которого были установлены генотипы 48 особей бурого медведя. Изучено влияние ряда факторов (способ консервации биологического материала, «свежесть» собранной пробы, композиция пищевых остатков и экспозиция биоматериала по отношению к солнечному свету) на сохранность ДНК в пробах и успешность получения генетического профиля особи. При совместной оценке изучаемых факторов достоверно значимое влияние на успешность амплификации имел состав пищевых остатков в пробе ($p < 0,05$). Установлено, что наличие ягод в экскрементах положительно влияет на консервацию молекулы ДНК и повышает результативность индивидуальной идентификации особи по микросателлитным локусам (наличие ПЦР-продуктов). Анализ каждого фактора независимо от остальных показал, что и «свежесть» собранной пробы, и метод ее консервации достоверно влияют на успешность амплификации и генотипирования. Наиболее пригодными для генетического анализа оказались пробы экскрементов, собранные в кратчайшие сроки после дефекации (свежие) и хранившиеся в солевом стабилизирующем растворе (Invitek). В результате исследования составлены рекомендации по использованию экскрементов животных в профильных генетических исследованиях.

Ключевые слова: бурый медведь; *Ursus arctos*; экскременты; неинвазивный сбор; метод; консервация; питание; выделение ДНК; микросателлитный анализ.

**A. S. Kuznetsova, K. F. Tirronen, D. V. Panchenko, J. Schregel,
E. A. Khizhkin. EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF SAMPLING AND
PRESERVING METHODS FOR NON-INVASIVE SAMPLES WHEN BROWN
BEAR POPULATION-GENETIC STUDIES ARE CONDUCTING**

The possibilities of using non-invasively sampled biological material to study the genetic diversity and status of the brown bear population in the European North of Russia are dis-

cussed. The effectiveness of sampling and preservation methods is evaluated. Fieldwork including non-invasive collection of biological material was carried out in the study area in spring, summer and autumn 2014–2016. The studied area covers the southeast of the Murmansk Region and the Republic of Karelia. 393 samples of bear feces were collected. We conducted DNA extraction from samples and genotyping with 8 microsatellite markers in the DNA laboratory of the NIBIO Svanhovd Research Station (Svanvik, Norway). 48 brown bear individuals were successfully identified. The influence of several factors (the preservation method, age of the collected sample, diet content and sun exposure) on the amplification success was studied. When we analyzed all factors together, only diet content had a significant effect on the amplification success ($p < 0.05$). The presence of berries in feces was found to have a positive effect on DNA and increased the effectiveness of genotyping. The analysis of each factor independently showed that both the 'freshness' of the sample and the method of its preservation significantly influenced the result of genotyping. Fresh feces and samples preserved in STOOL solution were the most suitable for genetic analysis. According to these results, recommendations for using noninvasively sampled biomaterial in population genetic studies are given.

Key words: brown bear; *Ursus arctos* L.; feces; non-invasive sampling; method; preservation; diet; DNA extraction; STR analysis.

Введение

Одним из основных инструментов современных популяционных исследований стал микросателлитный анализ. С его помощью производится идентификация отдельных особей, родственных взаимоотношений в семьях, отдельных группах или целых популяциях. Он применяется для оценки численности, определения области распространения вида, случаев межвидовой гибридизации и др. Микросателлитный анализ используется в популяционных исследованиях при изучении эффективного размера популяции, потока генов, структуры и генетического разнообразия [Schwartz et al., 1999, 2006; Kindberg, 2011; Swenson et al., 2011; Jansson et al., 2012].

Неинвазивный биологический материал (волосы, перья, конечные продукты метаболизма и т. д.) стал неотъемлемой частью многих генетических исследований, в том числе с использованием микросателлитных маркеров, и в последнее время широко применяется для решения различных научных задач [Reed et al., 1997; Wasser et al., 1997; Solberg et al., 2006; De Barba et al., 2010a; Kopatz et al., 2012, 2014; Bischof et al., 2016]. Данный подход имеет ряд преимуществ перед традиционными методами сбора проб. Он довольно прост в использовании, при этом позволяет избежать прямого контакта с животным, что минимизирует как степень воздействия на изучаемый объект, так и риски исследователей, например при работе с крупными хищниками, переносчиками опасных заболеваний и т. д. Неинвазивный сбор проб по сравнению с традиционными методами поиска и отлова животных обычно не требует су-

щественных материальных и трудовых затрат и позволяет получать достаточное количество биологических образцов для лабораторного анализа.

При работе с биоматериалом, бедным ДНК, таким как экскременты, существуют определенные сложности, вызывающие в дальнейшем ошибки генотипирования. Они связаны прежде всего с низким качеством и количеством ДНК объекта исследований, значительной примесью чужеродной ДНК (пищевых остатков, паразитов, бактерий и т. п.) и наличием ингибиторов полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Kohn, Wayne, 1997; Taberlet et al., 1999]. Для преодоления обозначенных трудностей ряд научных коллективов провели оценку методических приемов сбора, хранения и обработки биоматериала [Frantzen et al., 1998; Solberg et al., 2006; Murphy et al., 2000, 2003, 2007; De Barba et al., 2010b; Panasci et al., 2011; Lonsinger et al., 2015; Chih-Chin Shih et al., 2017]. В ходе этих исследований были определены факторы, влияющие на качество и количество ДНК в пробе и процесс амплификации, а также предложены рекомендации по работе с неинвазивными образцами. Большинство работ выполнены в условиях эксперимента, когда животные находились в неволе под наблюдением, а все исследуемые параметры строго контролировались. В связи с этим предложенные рекомендации не универсальны и не всегда могут быть применены в полевых условиях, когда у исследователей отсутствует точная информация по основным характеристикам проб экскрементов: их «возрасту», составу пищевых остатков, степени и объему воздействия факторов внешней среды и т. д.

Поэтому в рамках исследования генетического разнообразия и структуры населения бурого медведя Кольско-Карельского региона с целью разработки рекомендаций для проведения аналогичных полевых работ мы рассмотрели и проанализировали некоторые методические приемы сбора и консервации неинвазивных проб. Основными задачами исследования стали: анализ влияния ряда факторов на успех генотипирования и оценка возможности использования неинвазивных подходов при сборе биоматериала.

Объектом исследования был бурый медведь – важный структурный элемент таежных биоценозов. Являясь самым крупным хищником Европейского Севера России, медведь представляет опасность для человека и домашнего скота. Помимо этого бурый медведь – один из главных ресурсных видов и популярный объект охоты. Все это обуславливает необходимость мониторинга населения вида, комплексного изучения его биологии и экологии для научно обоснованного управления популяцией. Немаловажную роль в этих исследованиях приобрели методы молекулярной биологии, широко и повсеместно применяемые в настоящее время в популяционных исследованиях.

Материалы и методы

Полевые работы, включающие неинвазивный сбор биологического материала, выполнялись в Терском районе Мурманской области и Республике Карелия весной, летом и осенью 2014–2016 гг. В работе в качестве биоматериала – источника ДНК использованы экскременты бурого медведя. Среднее количество дефекаций медведя за сутки в летнее время составляет 12–14, в весеннее и осеннее – 5–8 [Пажетнов, 1990], поэтому образцы в природе представлены в достаточном количестве, кроме того, они легко идентифицируемы. Сбор образцов проводили на маршрутах, совмещая с учетом медведей по следам, а также в местах частого появления зверей и их концентраций. При сборе биоматериала использовались два метода консервации: в стабилизирующем растворе (Stool Collection Tube, Invitek) и в гранулированном силикагеле (КСКГ ГОСТ 3956–76).

Всего за время четырех экспедиций было собрано 393 пробы экскрементов бурого медведя, которые хранились в силикагеле. Для оценки эффективности различных консервантов часть проб (n=24) были зафиксированы двумя способами (с помощью стабилизирующего солевого раствора и силикагеля). Каждую про-

бу помещали в герметичную 30-мл пробирку, заполненную консервантом, и сопровождали описанием, содержащим дату и координаты места сбора образца, визуальную оценку «свежести», условно подразделяющуюся на «прошлогодние», «старые», «относительно свежие», «свежие». Определению давности пробы способствовал и разбор состава экскрементов, позволявший определить спектр кормов медведя на момент дефекации, а соответственно, и приблизительный «возраст» пробы к моменту ее сбора. К «прошлогодним», таким образом, были отнесены пробы предшествующего года («перезимовавшие»), к «старым» – образцы с условной давностью более месяца. «Относительно свежими» считали пробы, собранные в течение месяца после дефекации, «свежими» – образцы от 0 до 7 дней. В описание пробы также включали состав пищевых остатков, который оценивался визуально, путем разбора на месте либо позднее в лаборатории. Важными характеристиками пищевого поведения зверя являются его эврифагия и постепенная смена кормов в течение года. Тем не менее основу его питания в изучаемом регионе составляет растительность. Остатки животной пищи встречены в основном в образцах, собранных весной, в то время как экскременты, содержащие растительные остатки, получены во все сезоны, но с преобладанием их в пищевом рационе в летнее и осеннее время [Тирронен и др., 2016]. Образцы по преобладанию тех или иных компонентов были разделены на несколько групп: «трава», «ягоды», «ягоды и трава», «плоды», «желуди», «трава и муравьи», «ягоды и муравьи», «ягоды, трава и муравьи», «ягоды и остатки позвоночных животных», «муравьи», «остатки позвоночных животных».

В зависимости от того, где биоматериал был собран по отношению к солнцу, ему присваивали условную характеристику «тень», «полутень», «солнце». До проведения генетического анализа образцы хранились в темном прохладном месте в течение 1–8 месяцев.

Выделение ядерной ДНК из экскрементов производили с помощью PSP Spin Stool DNA Plus Kit (Invitek) (система для сбора, транспортировки и хранения образцов экскрементов и последующей очистки ДНК) в соответствии с инструкцией производителя и протоколом, опубликованным в статье [Linacre et al., 2011]. ПЦР-амплификация проводилась согласно протоколу, описанному в статье [Andreassen et al., 2012]. Использовали 8 микросателлитных маркеров, разработанных для бурого медведя: Mu05, Mu09, Mu10, Mu23, G10L, Mu50, Mu51, Mu59 [Taberlet et al., 1997]. ПЦР прово-

дили в объеме 10 μ л, содержащем 1x PCR Gold буфер, 200 μ M dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μ M каждого праймера, 1 ед. AmpliTaqGold ДНК полимеразы, 1x BSA и 1 μ л матричной ДНК. Протокол ПЦР: первоначальная денатурация при 95 °С в течение 10 минут, 35 циклов – 30 с при 94 °С, 30 с при 58 °С и 1 мин при 72 °С, финальная элонгация в течение 15 мин при 72 °С.

Капиллярный электрофорез осуществляли на генетическом анализаторе ABI 3130xl и ПЦР-продукты анализировались в GeneMapper 4.0 (ABI). Гомозиготные генотипы были подтверждены фрагментным анализом минимум в трех повторностях, а гетерозиготные – минимум в двух.

На основании результатов фрагментного анализа ПЦР-продуктов первых двух амплификаций (локусы Mu05/Mu23 или Mu09/Mu10) пробы с негативным результатом или с низким качеством были исключены из дальнейшего исследования.

Для оценки влияния изучаемых факторов на успешность индивидуальной идентификации особи бурого медведя по 8 микросателлитным локусам проведен одно- и многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA и MANOVA) в программе Statgraphics Plus 5.0. Статистически значимым влиянием фактора считали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

На основании проведенного микросателлитного анализа ДНК идентифицированы 48 особей бурого медведя. Из всей совокупности образцов, законсервированных в силикагеле ($n=393$), генотип по 8 микросателлитным локусам удалось установить в 24 % случаев ($n=96$). В образцах, хранившихся как в силикагеле, так и в растворе ($n=24$), генетический профиль по всем изучаемым локусам установлен в 12 ($n=3$) и 46 ($n=11$) % проб соответственно.

В дальнейших анализах мы использовали только данные по пробам, хранившимся в силикагеле. Очевидно, свежесть образца имеет большое значение для успешности генетического анализа, и чем меньше времени прошло с момента дефекации до сбора биоматериала, тем выше его пригодность для исследований. Всего для оценки этого параметра были использованы результаты генотипирования 369 образцов, в остальных случаях ($n=24$) возраст собранной пробы был не определен. Полученные нами результаты показали, что из 32 % «свежих» ($n=195$) и 20 % «относительно свежих» проб ($n=103$) удалось получить ДНК, пригодную для дальнейшего микросателлитного анализа.

Доля проб с успешной амплификацией ДНК, выделенной из «старых» образцов, составила 11 % ($n=18$), в «прошлогодных» – 13 % ($n=53$). Большее количество «прошлогодных» образцов по сравнению со «старыми» объясняется тем, что они были собраны во время первой весенней экспедиции 2014 года, в последующем мы старались не производить сбор старых образцов, если свежие имелись в достаточном количестве.

В таблице представлены результаты определения генотипа бурого медведя по 8 микросателлитным локусам для образцов, дифференцированных на группы по преобладающему пищевому компоненту в пробе. Общее число проб, проанализированных по данному параметру, составило 385, в оставшихся образцах ($n=8$) состав не был определен. Наиболее пригодными для анализа оказались экскременты, состоявшие главным образом из различных ягод и плодов деревьев (яблоня, черноплодная и дикая рябина), в то время как в пробах с преобладанием травянистых остатков наблюдалась крайне низкая результативность генотипирования.

Из проб с характеристикой «тень» ($n=12$) идентифицировать особь бурого медведя удалось в 33 % ($n=4$) случаев, а из образцов, собранных в «полутени» ($n=63$) и на «солнце» ($n=128$), в 17 ($n=12$) и 23 ($n=28$) % соответственно. Всего присвоенной характеристикой обладали 203 образца.

Сохранность ДНК в пробе и успешность амплификации зависят от типа консерванта. Выполненный нами однофакторный дисперсионный анализ показал достоверно значимое влияние этого фактора ($F = 8,80$; $p = 0,0048$).

Для оценки влияния факторов свежести, состава экскрементов и освещенности на успех генотипирования мы провели многофакторный дисперсионный анализ. Оказалось, что при совместном анализе параметров только состав пищевых остатков в пробе достоверно значим ($F = 2,82$; $p = 0,0014$).

Анализируя каждый фактор независимо от остальных, мы установили, что свежесть пробы имела достоверное влияние на успех генотипирования ($F = 4,35$; $p = 0,0050$). Наши результаты показали, что чем короче временной промежуток между моментом дефекации и сбором образца, тем идентификация особи успешнее (рис., а). Состав пищевых остатков также оказывал значимое воздействие ($F = 2,98$; $p = 0,0002$), при этом достоверно наилучший результат генотипирования был отмечен в ягодных пробах ($F = 10,38$; $p = 0,0014$) (рис., б), тогда как травяные образцы оказа-

Успешность получения генотипа бурого медведя по 8 микросателлитным локусам в зависимости от состава остатков корма в экскрементах

The success of obtaining the brown bear genotype using 8 STR markers depending on the composition of food residues in the bear's feces

Преобладающий компонент Dominant component	Количество проб данного состава Number of samples	Доля определенных генотипов, абс. (%) Number of identified genotypes, abs. (%)
трава grass	162	23 (14)
ягоды berries	87	31 (36)
трава и муравьи grass and ants	39	7 (18)
ягоды и трава berries and grass	27	7 (27)
плоды fruits	26	13 (50)
ягоды и муравьи berries and ants	10	7 (70)
ягоды и остатки позвоночных животных berries and vertebrates	9	1 (11)
ягоды, трава и муравьи berries, grass and ants	8	2 (25)
остатки позвоночных животных vertebrates	8	2 (25)
муравьи ants	5	0 (0)
желуди acorns	4	1 (25)

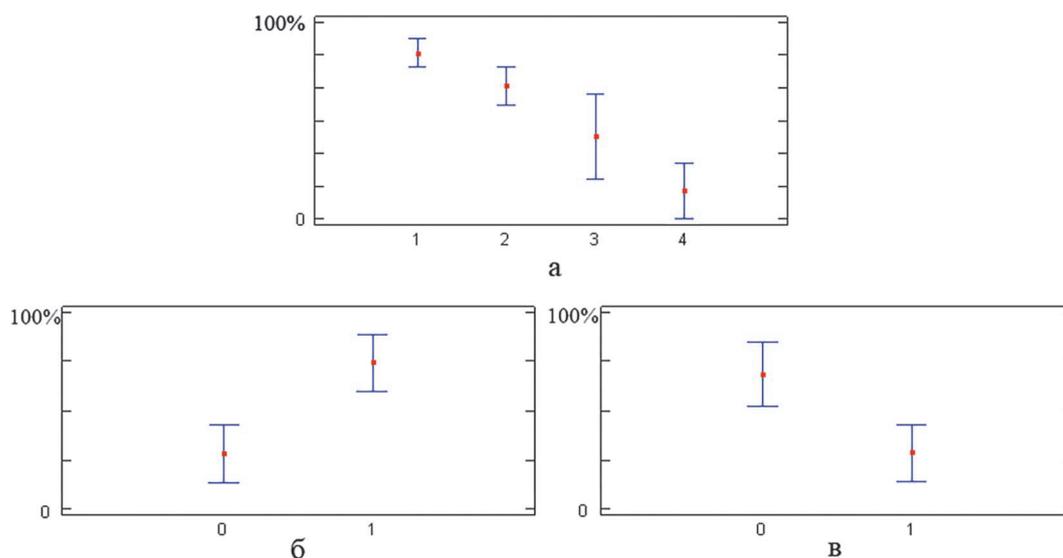
лись малопригодными для выделения ДНК и ее дальнейшего анализа ($F = 5,88$; $p = 0,0158$) (рис., в).

Выбор консерванта – одна из главных задач исследования, основанного на использовании биоматериала, бедного ДНК. Он должен быть простым и удобным в использовании и транспортировке и обладать высокими консервирующими характеристиками. Авторы работы [Wasser et al., 1997] предлагали в качестве идеальной альтернативы методам заморозки и хранения образца в стабилизирующих буферах применение силикагеля. Результаты нашего исследования показали лучшую сохранность ДНК в пробах, хранившихся в стабилизирующем солевом растворе, по сравнению с силикагелем. Согласно инструкции производителя, пробы, законсервированные таким образом, 3 месяца могут храниться при комнатной температуре, что применительно в полевых условиях, также сам раствор содержит стабилизатор ДНК, который инактивирует ДНКазы и предотвращает деградацию ДНК.

Несмотря на предполагаемое существенное влияние фактора «свежести» пробы на сохранность ДНК в ней, его значимость была выявлена только при однофакторном анализе. Вероятно, это объясняется тем, что до самой процедуры выделения ДНК образцы хранились

в консерванте длительный промежуток времени, и даже в тех пробах, которые были собраны условно в первый день с момента дефекации, могло произойти разрушение ДНК. Дегградация ДНК в результате воздействия комплекса внешних факторов делает «старые» образцы малопригодными для исследования. Возникает вопрос о целесообразности использования таких проб с учетом высоких финансовых затрат на выделение ДНК и генетический анализ в тех случаях, когда в полевых условиях существует возможность сбора свежего биоматериала в достаточном объеме. Однако важно отметить, что ДНК удалось получить даже из некоторой части прошлогодних, «перезимовавших» проб, хотя некоторые авторы говорят о непродуктивности использования проб давностью более 5 дней [Piggott, 2004; Santini et al., 2007; Panasci et al., 2011]. Наши исследования показали, что при правильном выборе консерванта, условий хранения и протокола для выделения возможно выделение ДНК из очень старых образцов.

В ходе исследования подтверждено предполагаемое влияние состава пищи на успешность выделения ДНК из экскрементов и амплификацию, что также отмечено в ряде других работ [Murphy et al., 2003; Panasci et al., 2011]. Возможно, лучшая сохранность ДНК в ягодных пробах объясняется наличием природных консер-



Влияние факторов «свежесть» (а) и «состав пищевых остатков» (б, в) на успешность идентификации бурого медведя по 8 микросателлитным локусам (MANOVA анализ выполнен в Statgraphics Plus 5.0).

По оси Y: доля проб с успешной идентификацией генотипа (%);

(а) по оси X: 1 – свежие образцы, 2 – относительно свежие, 3 – старые, 4 – прошлогодние;

(б) по оси X: 0 – ягоды отсутствовали, 1 – пробы, содержащие остатки ягод;

(в) по оси X: 0 – травяная растительность отсутствовала, 1 – пробы травяного состава

The influence of ageing factor and diets on the success of the identification of brown bears genotype.

Y-axis: the number of samples with identified brown bear individuals (%);

(а) on the X-axis: 1 – fresh samples, 2 – relatively fresh, 3 – old, 4 – last year samples;

(б) on the X-axis: 0 – berries were absent, 1 – samples containing residues of berries;

(в) on the X-axis: 0 – grass was absent, 1 – samples with grass

вантов в их составе [Panasci et al., 2011], тогда как крайне низкий успех генотипирования ДНК из проб травяного состава, возможно, связан с наличием в них ингибиторов ПЦР, о чем также упоминают некоторые авторы [Kohn, Wayne, 1997].

Еще одним фактором, способным оказать воздействие на молекулу ДНК, является солнечный свет, а именно УФ-излучение. В нашем исследовании доказать его достоверное воздействие на успех амплификации не удалось. Изучение негативного воздействия УФ-излучения проводится в контролируемых условиях эксперимента, и повреждения ДНК определяются с помощью специальных методов (высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС)) [Ravanat et al., 2001]. Все пробы в нашем исследовании получены в ходе полевых работ и характеристика солнечной экспозиции места сбора проб присвоена без точного определения негативного воздействия УФ-излучения на молекулу ДНК в образце, поэтому разделение проб по заданному параметру выполнено весьма условно, вследствие чего реальная оценка влияния анализируемого фактора не была произведена.

Заключение

Анализ воздействия различных факторов на сохранность ДНК объекта исследований в экскрементах позволяет рекомендовать при использовании неинвазивного биоматериала следующие позиции: 1) наиболее пригодным консервирующим агентом следует признать специализированный стабилизирующий солевой раствор; 2) для успешного выделения ДНК и амплификации рекомендуется использовать образцы, содержащие ягоды, а благоприятным временем сбора проб является период активного плодоношения этих растений; 3) использование наиболее свежих образцов при наличии биоматериала в достаточном количестве. Включение в исследования старых образцов возможно при недостатке свежего биоматериала, а также при целенаправленной оценке ряда экологических параметров вида.

Несмотря на низкую в некоторых случаях результативность генотипирования, мы считаем целесообразным использование экскрементов в качестве источника ДНК при проведении различных генетических исследований. Такой подход не несет в себе избирательного характера,

и данные, получаемые с помощью неинвазивно собираемого биоматериала, способны отразить реальную демографическую структуру и актуальное состояние изучаемой популяции. Кроме того, такой биоматериал активно используется во всех популяционно-генетических исследованиях. Оптимизация метода сбора проб, а также их правильное хранение до процедуры выделения ДНК позволяют повысить качество конечных результатов исследования, не увеличивая материальные затраты.

Финансовое обеспечение исследования осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0080) и средств РФФИ (проект № 18-05-00646).

Литература

- Пажетнов В. С. Бурый медведь. М.: Агропромиздат, 1990. 215 с.
- Тирронен К. Ф., Панченко Д. В., Кузнецова А. С. Новые данные о питании бурого медведя (*Ursus arctos*) Карелии и юга Кольского полуострова // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 12. С. 114–122. doi: 10.17076/eco513
- Andreassen R., Schregel J., Kopatz A., Tobiasen C., Knappskog P. M., Hagen S. B., Kleven O., Schneider M., Kojola I., Aspi J., Rykov A., Tirronen K. F., Danilov P. I., Eiken H. G. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*) // Forensic Sci. Int. Genet. 2012. Vol. 6(6). P. 798–809. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.002
- Bischof R., Gregersen E. R., Brøseth H., Ellegren H., Flagstad Ø. Noninvasive genetic sampling reveals intraspecific territoriality in wolverines // Ecol. Evol. 2016. Vol. 6(5). P. 1527–1536. doi: 10.1002/ece3.1983
- Chih-Chin Shih, Sung-Lin Wu, Mei-Hsiu Hwang, Ling-Ling Lee. Evaluation on the effects of ageing factor, sampling and preservation methods on Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) noninvasive DNA amplification // Taiwan. 2017. Vol. 62(4). P. 363–370. doi: 10.6165/tai.2017.62.363
- De Barba M., Waits L. P., Garton E. O., Genovesi P., Randi E., Mustoni A., Groff C. The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population // Mol. Ecol. 2010a. Vol. 19. P. 3938–3951. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04791.x
- De Barba M., Waits L. P., Genovesi P., Randi E., Chirichella R., Cetto E. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population // J. Appl. Ecol. 2010b. Vol. 47. P. 172–181. doi: 10.1111/j.1365-2664.2009.01752.x
- Frantzen M. A., Silk J. B., Ferguson J. W., Wayne R. K., Kohn M. H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA // Mol. Ecol. 1998. Vol. 7, no. 10. P. 1423–1428. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x
- Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. Rise and fall of a wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline // Mol. Ecol. 2012. Vol. 21. P. 5178–5193. doi: 10.1111/mec.12010
- Kindberg J., Swenson J., Ericsson G., Bellemain E., Miquel C., Taberlet P. Estimating population size and trends of the Swedish brown bear *Ursus arctos* population // Wildl. Biol. 2011. Vol. 17, no. 2. P. 114–123. doi: 10.2981/10-100
- Kohn M. H., Wayne R. K. Facts from feces revisited // Trends Ecol. Evol. 1997. Vol. 12, no. 6. P. 223–227.
- Kopatz A., Eiken H. G., Aspi J., Kojola I., Tobiasen C., Tirronen K. F., Danilov P. I., Hagen S. B. Admixture and gene flow from Russia in the recovering Northern European brown bear (*Ursus arctos*) // PLoS One. 2014. Vol. 9, iss. 5. P. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097558
- Kopatz A., Eiken H. G., Hagen S. B., Ruokonen M., Esparza-Salas R., Schregel J., Kojola I., Smith P. E., Warttinen I., Aspholm P. E., Wikan S., Rykov A. M., Makarova O., Polikarpova N., Tirronen K. F., Danilov P. I., Aspi J. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe // Conserv. Genet. 2012. Vol. 13, no. 3. P. 681–692. doi: 10.1007/s10592-012-0317-2
- Linacre A., Gusmao L., Hecht W., Hellman A. P., Mayr W. R., Parson W., Prinz M., Schneider P. M., Morling N. ISFG: Recommendations regarding the use of nonhuman (animal) DNA in forensic genetic investigations // Forensic Sci. Int. Genet. 2011. Vol. 5. P. 501–505. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.10.017
- Lonsinger R. C., Gese E. M., Dempsey S. J., Kluever B. M., Johnson T. R., Waits L. P. Balancing sample accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores // Mol. Ecol. Resour. 2015. Vol. 15(4). P. 831–842. doi: 10.1111/1755-0998.12356
- Murphy M., Kendall K., Robinson A., Waits L. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification // Conserv. Genet. 2007. Vol. 8. P. 1219–1224. doi: 10.1007/s10592-006-9264-0
- Murphy M., Waits L., Kendall K. Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis // Wildl. Soc. Bull. 2000. Vol. 28, no. 4. P. 951–957. doi: 10.2307/3783853
- Murphy M., Waits L., Kendall K. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*) // Mol. Ecol. 2003. Vol. 12. P. 2261–2265. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01863.x
- Panasci M., Ballard W. B., Breck S., Rodriguez D., Liewellyn D., Densmore L. D., Wester D. B., Baker R. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success // J. Wildl. Manag. 2011. Vol. 75. P. 1616–1624. doi: 10.1002/jwmg.221
- Piggott M. P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA // Wildl. Res. 2004. Vol. 31. P. 485–493. doi: 10.1071/WR03096
- Ravanat J. L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2001. Vol. 63. P. 88–102.

Reed J. Z., Tollit D. J., Thompson P. M., Amos W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6, no. 3. P. 225–234. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x

Santini A., Lucchini V., Fabbri E., Randi E. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf (*Canis lupus*) excremental DNA samples // *Mol. Ecol. Notes.* 2007. Vol. 7. P. 955–961. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01829.x

Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 22, no. 1. P. 25–33. doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009

Schwartz M. K., Tallmon D. A., Luikart G. Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility // *Anim. Conserv.* 1999. Vol. 2. P. 321–323. doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00079.x

Solberg K. H., Bellemain E., Drageset O. M., Taberlet P., Swenson J. E. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus*

arctos) population size // *Biol. Conserv.* 2006. Vol. 128. P. 158–168. doi: 10.1016/j.biocon.2005.09.025

Swenson J., Taberlet P., Bellemain E. Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos* // *Mamm. Rev.* 2011. Vol. 41, no. 2. P. 87–98. doi: 10.1111/j.1365-2907.2010.00179.x

Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap // *Trends Ecol. Evol.* 1999. Vol. 14, no. 8. P. 323–327. doi: 10.1016/j.jtcs.2018.08.053

Taberlet P., Camarra J. J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 869–876. doi: 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x

Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G., Fain S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids // *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 1091–1097. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x

Поступила в редакцию 26.03.2019

References

Pazhetnov V. S. Buryi medved' [Brown bear]. Moscow: Agropromizdat, 1990. 215 p.

Tirronen K. F., Panchenko D. V., Kuznetsova A. S. Novye dannye o pitanii burogo medvedya Karelii i yuga Kol'skogo poluostrova [New data on the diets of the brown bear (*Ursus arctos*) in Karelia and the south of the Kola Peninsula]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 12. P. 114–122. doi: 10.17076/eco513

Andreassen R., Schregel J., Kopatz A., Tobiasen C., Knappskog P. M., Hagen S. B., Kleven O., Schneider M., Kojola I., Aspi J., Rykov A., Tirronen K. F., Danilov P. I., Eiken H. G. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012. Vol. 6(6). P. 798–809. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.002

Bischof R., Gregersen E. R., Brøseth H., Ellegren H., Flagstad Ø. Noninvasive genetic sampling reveals intra-sex territoriality in wolverines. *Ecol. Evol.* 2016. Vol. 6(5). P. 1527–1536. doi: 10.1002/ece3.1983

Chih-Chin Shih, Sung-Lin Wu, Mei-Hsiu Hwang, Ling-Ling Lee. Evaluation on the effects of ageing factor, sampling and preservation methods on Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) noninvasive DNA amplification. *Taiwania.* 2017. Vol. 62(4). P. 363–370. doi: 10.6165/tai.2017.62.363

De Barba M., Waits L. P., Garton E. O., Genovesi P., Randi E., Mustoni A., Groff C. The power of genetic monitoring for studying demography, ecology and genetics of a reintroduced brown bear population. *Mol. Ecol.* 2010a. Vol. 19. P. 3938–3951. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04791.x

De Barba M., Waits L. P., Genovesi P., Randi E., Chirichella R., Cetto E. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population. *J. Appl. Ecol.* 2010b. Vol. 47. P. 172–181. doi: 10.1111/j.1365-2664.2009.01752.x

Frantzen M. A., Silk J. B., Ferguson J. W., Wayne R. K., Kohn M. H. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* 1998. Vol. 7, no. 10. P. 1423–1428. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x

Jansson E., Ruokonen M., Kojola I., Aspi J. Rise and fall of a wolf population: genetic diversity and structure during recovery, rapid expansion and drastic decline. *Mol. Ecol.* 2012. Vol. 21. P. 5178–5193. doi: 10.1111/mec.12010

Kindberg J., Swenson J., Ericsson G., Bellemain E., Miquel C., Taberlet P. Estimating population size and trends of the Swedish brown bear *Ursus arctos* population. *Wildl. Biol.* 2011. Vol. 17, no. 2. P. 114–123. doi: 10.2981/10-100

Kohn M. H., Wayne R. K. Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol.* 1997. Vol. 12, no. 6. P. 223–227.

Kopatz A., Eiken H. G., Aspi J., Kojola I., Tobiasen C., Tirronen K. F., Danilov P. I., Hagen S. B. Admixture and gene flow from Russia in the recovering Northern European brown bear (*Ursus arctos*). *PLoS One.* 2014. Vol. 9, iss. 5. P. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097558

Kopatz A., Eiken H. G., Hagen S. B., Ruokonen M., Esparza-Salas R., Schregel J., Kojola I., Smith P. E., Warttinen I., Aspholm P. E., Wikan S., Rykov A. M., Makarova O., Polikarpova N., Tirronen K. F., Danilov P. I., Aspi J. Connectivity and population subdivision at the fringe of a large brown bear (*Ursus arctos*) population in North Western Europe. *Conserv. Genet.* 2012. Vol. 13, no. 3. P. 681–692. doi: 10.1007/s10592-012-0317-2

Linacre A., Gusmao L., Hecht W., Hellman A. P., Mayr W. R., Parson W., Prinz M., Schneider P. M., Morling N. ISFG: Recommendations regarding the use of nonhuman (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011. Vol. 5. P. 501–505. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.10.017

Lonsinger R. C., Gese E. M., Dempsey S. J., Kluever B. M., Johnson T. R., Waits L. P. Balancing sample

accumulation and DNA degradation rates to optimize noninvasive genetic sampling of sympatric carnivores. *Mol. Ecol. Resour.* 2015. Vol. 15(4). P. 831–842. doi: 10.1111/1755-0998.12356

Murphy M., Kendall K., Robinson A., Waits L. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification. *Conserv. Genet.* 2007. Vol. 8. P. 1219–1224. doi: 10.1007/s10592-006-9264-0

Murphy M., Waits L., Kendall K. Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis. *Wildl. Soc. Bull.* 2000. Vol. 28, no. 4. P. 951–957. doi: 10.2307/3783853

Murphy M., Waits L., Kendall K. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Mol. Ecol.* 2003. Vol. 12. P. 2261–2265. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01863.x

Panasci M., Ballard W. B., Breck S., Rodriguez D., Liewellyn D., Densmore L. D., Wester D. B., Baker R. Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. *J. Wildl. Manag.* 2011. Vol. 75. P. 1616–1624. doi: 10.1002/jwmg.221

Piggott M. P. Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA. *Wildl. Res.* 2004. Vol. 31. P. 485–493. doi: 10.1071/WR03096

Ravanat J. L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2001. Vol. 63. P. 88–102.

Reed J. Z., Tollit D. J., Thompson P. M., Amos W. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6, no. 3. P. 225–234. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x

Santini A., Lucchini V., Fabbri E., Randi E. Ageing and environmental factors affect PCR success in wolf

(*Canis lupus*) excremental DNA samples. *Mol. Ecol. Notes.* 2007. Vol. 7. P. 955–961. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01829.x

Schwartz M. K., Luikart G., Waples R. S. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 22, no. 1. P. 25–33. doi: 10.1016/j.tree.2006.08.009

Schwartz M. K., Tallmon D. A., Luikart G. Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility. *Anim. Conserv.* 1999. Vol. 2. P. 321–323. doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00079.x

Solberg K. H., Bellemain E., Drageset O. M., Taberlet P., Swenson J. E. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biol. Conserv.* 2006. Vol. 128. P. 158–168. doi: 10.1016/j.biocon.2005.09.025

Swenson J., Taberlet P., Bellemain E. Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*. *Mamm. Rev.* 2011. Vol. 41, no. 2. P. 87–98. doi: 10.1111/j.1365-2907.2010.00179.x

Taberlet P., Camarra J. J., Griffin S., Uhres E., Hannotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 869–876. doi: 10.1111/j.1365-294X.1997.tb00141.x

Taberlet P., Waits L. P., Luikart G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 1999. Vol. 14, no. 8. P. 323–327. doi: 10.1016/j.jtvc.2018.08.053

Wasser S. K., Houston C. S., Koehler G. M., Cadd G. G., Fain S. R. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol. Ecol.* 1997. Vol. 6. P. 1091–1097. doi: 10.1046/j.1365-294X.1997.00281.x

Received March 26, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Кузнецова Анастасия Сергеевна

аспирант, стажер-исследователь
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kuznecova_nastya@inbox.ru
тел.: (8142) 573140

Тирронен Константин Феликсович

заведующий лаб. зоологии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: kostja.t@mail.ru
тел.: (8142) 573140

CONTRIBUTORS:

Kuznetsova, Anastasiia

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kuznecova_nastya@inbox.ru
tel.: (8142) 573140

Tirronen, Konstantin

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: kostja.t@mail.ru
tel.: (8142) 573140

Панченко Данила Владимирович

старший научный сотрудник лаборатории зоологии, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: danja@inbox.ru
тел.: (8142) 573140

Шрегель Джулия

PhD
Норвежский Институт Биоэкономических исследований
NO-9925 Сванвик, Норвегия
эл. почта: julia.schregel@nibio.no

Хижкин Евгений Александрович

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
Федеральный исследовательский центр
«Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910

преподаватель
Петрозаводский государственный университет
пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия,
Россия, 185910
эл. почта: hizhkin84@mail.ru
тел.: (8142) 573107

Panchenko, Danila

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: danja@inbox.ru
tel.: (8142) 573140

Schregel, Julia

Norwegian Institute for Bioeconomy, Svanhovd
NO-9925 Svanvik, Norway
e-mail: julia.schregel@nibio.no

Khizhkin, Evgeny

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
Petrozavodsk State University
33 Lenin St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: hizhkin84@mail.ru
tel.: (8142) 573107