

***Волнистый Арсений Андреевич***

научный сотрудник

***Семенова Анастасия Александровна***

научный сотрудник

***Молчан Владислав Олегович***

младший научный сотрудник

***Соловей Оксана Эдуардовна***

научный сотрудник

***Дашевская Лидия Олеговна***

младший научный сотрудник

***Лобановская Полина Юрьевна***

научный сотрудник

***Гомель Константин Вячеславович***

старший научный сотрудник

***Никифоров Михаил Ефимович***

академик национальной академии наук Беларуси

ГНПО «НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам»

г. Минск, Республика Беларусь

DOI 10.31483/r-110717

**ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НЕИНВАЗИВНЫХ МЕТОДОВ  
ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА  
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
БИОРАЗНООБРАЗИЯ ЖИВОТНЫХ**

*Аннотация: в статье приводятся актуальные данные, результаты и перспективы использования редких материалов для молекулярно-генетических исследований природного биоразнообразия. Описываются современные тенденции в использовании материалов для молекулярно-генетических исследований в областях филогенетики, филогеографии и популяционной структуры диких видов*

*животных. Выделяются преимущества использования редких, неинвазивных методов получения генетического материала диких животных и достижения молекулярно-генетических исследований на их основе с использованием современных технологий. Выводится заключение о значительных возможностях для расширения генетических коллекций и улучшения методов молекулярно-генетических исследований биоразнообразия посредством активного использования неинвазивных материалов в качестве источников генетического материала.*

**Ключевые слова:** молекулярная генетика, неинвазивные методы, древняя ДНК, генетические коллекции.

Молекулярно-генетические методы на сегодня являются неотъемлемым элементом исследований происхождения, состояния и свойств дикой флоры и фауны. Одним из фундаментальных аспектов подобных исследований, включающих в себя методы молекулярно-генетического анализа, являются используемые источники генетического материала [18]. Используемый генетический материал определяет как предельную разрешающую способность для любых методов молекулярно-генетического анализа ввиду состояния маркерных молекул, так и реалистичные размеры задействованных в анализе выборок – ввиду трудовых и ресурсных затрат на сбор, транспортировку, хранение и обработку материала [19; 25].

Ввиду значительного фокуса на качестве получаемых данных, в молекулярно-генетических исследованиях фауны исторически превалирует использование материала образцов инвазивного характера, в первую очередь мышечных тканей, органов и крови животных, обеспечивающих наилучшее качество изолируемой из образцов ДНК, и следовательно максимальное качество и успех большинства даунстримных аналитических результатов, таких как амплификация, рестрикция, клонирование, Сэнгеровское секвенирование и секвенирование нового поколения [8]. Однако подобные источники генетического материала характеризуются также и набором недостатков, в особенности затрагивающих области формирования коллекций и этики. Сбор свежих образцов тканей требует органи-

зации и исполнения зачастую дорогостоящих и трудоёмких мероприятий по добыче животных, после чего образцы нуждаются в хранении при специфических условиях для минимизации ущерба генетическому материалу образцов под воздействием собственных внутриклеточных энзимов [5]. При этом подобные мероприятия неизбежно являются деструктивными и инвазивными по отношению к объекту исследования, непосредственно вмешиваясь в выживание действующей популяции и оказывая зачастую нежелательное воздействие на исследуемую популяцию [15; 20; 21], что особо проблематично при исследовании популяций охраняемых и уязвимых видов.

Альтернативой является использование неинвазивных методов получения генетических материалов – таких как сбор сброшенных покровных тканей животных (рога, шерсть, перья) [16; 17], останков (костный материал, погадки) [1], фекалий [10; 12], отбор проб от объектов хранения музейных коллекций и археологических образцов [11; 24; 26]. Многочисленные современные публикации сообщают об эффективности неинвазивных методов и материалов для проведения молекулярно-генетических исследований на основании методов анализа полиморфизма тандемных повторов, панелей однонуклеотидных полиморфизмов, RADseq и даже полногеномного анализа при использовании современных подходов к обработке материала [12; 22; 26], и сообщают об успешном использовании материала неинвазивного происхождения для молекулярно-генетических и геномных исследований [9; 14].

В настоящем материале мы сообщаем об успешном использовании аналогичных подходов для серии исследований, включающих изучение популяционной структуры и происхождения благородного оленя *Cervus elaphus* в Беларуси с использованием сброшенных рогов в качестве материала [7; 23; 27], исследовании популяции лошади Пржевальского из Полесского Государственного Радиационно-Экологического Заповедника и определения потока генов американской норки *Neogale vison* [6] посредством анализа фекальных образцов [2], определении подвидовой структуры *Tetrao urogallus* [3; 4] и филогеографии чёрного аиста *Ciconia nigra* с использованием перьев в качестве материала образцов.

Также в настоящий момент осуществляются работы по исследованию популяционной динамики обыкновенного канюка *Buteo buteo* на протяжении XX века посредством анализа материала музейного происхождения, характеристике генетического разнообразия в уязвимой популяции водяной полёвки *Arvicola amphibicus* на основании материала погадок, выявлению гибридизации дикой собаки и волка *Canis lupus*, а также описанию динамики восстановления популяции бобра *Castor fiber* на основании музейных образцов кости. Во всех перечисленных случаях авторами были получены данные достаточного качества посредством использования современных методов обработки материала и генотипирования.

Мы желаем уделить отдельное внимание эффективности оппортунистического неинвазивного сбора материала [13], и подчеркнуть пользу подобных подходов в отношении расширения аналитических выборок и обеспечении доступа к материалу охраняемых видов без какого-либо вреда для популяций, а также в расширении возможностей генетических коллекций [19]. Помимо этого, оппортунистический сбор материала широко применим в ходе совместных исследований нескольких объектов. В качестве примера можно привести исследования диеты крупных птиц: материал погадок одновременно применим как для анализа диеты, так и как оппортунистический генетический материал для изучения популяций мелких грызунов.

Суммируя, несмотря на их определённые ограничения, такие как непригодность для анализа генетической трансляции, при использовании современных подходов неинвазивные методы сбора генетического материала демонстрируют свою высокую эффективность и перспективность для использования в молекулярно-генетических исследованиях дикой фауны на новом уровне в плане доступности, масштаба и этики. Мы призываем коллег к активному внедрению неинвазивных методов в исследованиях биоразнообразия, а также к мобилизации классических зоологических коллекций для молекулярно-генетических исследований.

### ***Список литературы***

1. Amaral A. Detection of hybridization and species identification in domesticated and wild quails using genetic markers / A. Amaral, A. Silva, A. Grosso [et al.] // *Folia Zoologica*. – 2007. – Vol. 56.
2. Genetic diversity of the free-living population of Przewalski's horses in the Chernobyl Exclusion Zone / E.E. Kheidorova, K.V. Homel, M.E. Nikiforov [et al.] // *Theriol. Ukr.* – 2021. – Vol. 2020. №20. – P. 58–66.
3. Homel K. Genetic structure and diversity of the capercaillie (*Tetrao urogallus*) population in Belarus in the context of de-lineation of two subspecies: major and pleskei / K. Homel, T. Pavlushchick, M. Nikiforov [et al.] // *GEO&BIO*. – 2022. – Vol. 2022. №22. – P. 113–128.
4. Homel K.V. Genetic Diversity and Place in the General Phylogeographic Structure of Capercaillie, *Tetrao Urogallus* (Galliformes, Phasianidae), from Belarus / K.V. Homel, T.E. Pavlushchick, M.E. Nikiforov [et al.] // *Vestnik Zoologii*. – 2019. – Vol. 53. №5. – P. 385–398. DOI 10.2478/vzoo-2019-0035. EDN ATVEYO
5. McNevin D. Preservation of and DNA Extraction from Muscle Tissue / D. McNevin // *Forensic DNA Typing Protocols: Methods in Molecular Biology* / ed. W. Goodwin. – New York: Springer New York, 2016. – Vol. 1420. – P. 43–53.
6. Valnisty A.A. Molecular genetic polymorphism of American mink populations (*Neovison vison*) in model fur farms and on the adjacent territories in Belarus / A.A. Valnisty, K.V. Homel, E.E. Kheidorova [et al.] // *Dokl. Akad. nauk.* – 2020. – Vol. 64. №6. – P. 685–693.
7. Valnisty A.A. Reintroduction shapes the genetic structure of the red deer (*Cervus elaphus*) population in Belarus / A.A. Valnisty, K.V. Homel, E.E. Kheidorova [et al.] // *Theriol. Ukr.* – 2022. – Vol. 2022. №23. – P. 31–46.
8. Angeloni F. Genomic toolboxes for conservation biologists / F. Angeloni, N. Wagemaker, P. Vergeer, J. Ouborg // *Evolutionary Applications*. – 2012. – Vol. 5. №2. – P. 130–143.
9. Banks S.C. Non-invasive genetic sampling is one of our most powerful and ethical tools for threatened species population monitoring: a reply to Lavery et al. /

S.C. Banks, M.P. Piggott // *Biodivers Conserv.* – 2022. – Vol. 31. №2. – P. 723–728. DOI 10.1007/s10531-022-02377-x. EDN DWJGZO

10. Borrelli, L. Fecal Sample Collection Method for Wild Birds-Associated Microbiome Research: Perspectives for Wildlife Studies / L. Borrelli, A. Minichino, A. Pace [et al.] // *Animals.* – 2020. – Vol. 10. №8. – P. 1349.

11. Carroll, E.L. Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods / E.L. Carroll, M.W. Bruford, J.A. DeWoody [et al.] // *Evol Appl.* – 2018. – Vol. 11. №7. – P. 1094–1119. DOI 10.1111/eva.12600. EDN YFSCJF

12. Chiou K.L. Methylation-based enrichment facilitates low-cost, noninvasive genomic scale sequencing of populations from feces / K.L. Chiou, C.M. Bergey // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. №1. – P. 1975.

13. De Barba, M. Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population / M. De Barba, L.P. Waits, P. Genovesi [et al.] // *Journal of Applied Ecology.* – 2010. – Vol. 47. №1. – P. 172–181.

14. DEMatteo K.E. Noninvasive techniques provide novel insights for the elusive bush dog (*Speothos venaticus*): Noninvasive Techniques *Speothos venaticus* / K.E. DEMatteo, M.A. Rinas, C.F. Argüelles [et al.] // *Wildl. Soc. Bull.* – 2014. – Vol. 38. №4. – P. 862–873.

15. Field work ethics in biological research / M.J. Costello, K.H. Beard, R.T. Corlett [et al.] // *Biological Conservation.* – 2016. – Vol. 203. – P. 268–271.

16. Henry P. A Noninvasive Hair Sampling Technique to Obtain High Quality DNA from Elusive Small Mammals / P. Henry, A. Henry, M.A. Russello // *JoVE.* – 2011. №49. – P. 2791.

17. Hoffmann G.S. An improved high yield method to obtain microsatellite genotypes from red deer antlers up to 200 years old / G.S. Hoffmann, E.M. Griebeler // *Mol Ecol Resour.* – 2013. – Vol. 13. №3. – P. 440–446.

18. Hohenlohe P.A. Population genomics for wildlife conservation and management / P.A. Hohenlohe, W.C. Funk, O.P. Rajora // *Molecular Ecology.* – 2021. – Vol. 30, №1. – P. 62–82. DOI 10.1111/mec.15720. EDN XCMJMC

19. Holt W.V. Genome resource banking for wildlife conservation: promises and caveats / W.V. Holt, P. Comizzoli // *Cryo Letters*. – 2021. – Vol. 42. №6. – P. 309–320.
20. McMahon C.R. Publish or perish: why it's important to publicise how, and if, research activities affect animals / C.R. McMahon, M.A. Hindell, R.G. Harcourt // *Wildl. Res.* – 2012. – Vol. 39. №5. – P. 375.
21. Russo D. Collection of voucher specimens for bat research: conservation, ethical implications, reduction, and alternatives / D. Russo, L. Ancillotto, A.C. Hughes [et al.] // *Mammal Review*. – 2017. – Vol. 47. №4. – P. 237–246. DOI 10.1111/mam.12095. EDN YGLEIF
22. Smith O. When can noninvasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies? / O. Smith, J. Wang // *Molecular Ecology Resources*. – 2014. – Vol. 14. №5. – P. 1011–1023. DOI 10.1111/1755-0998.12250. EDN UWNEIH
23. Valnisty A.A. Between the lines: mitochondrial lineages in the heavily managed red deer population of Belarus / A.A. Valnisty, K.V. Homel, E.E. Kheidorova [et al.] // *Mamm Biol.* – 2024. – Vol. 104. №2. – P. 205–214.
24. Waits L.P. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection / L.P. Waits, D. Paetkau // *Journal of Wildlife Management*. – 2005. – Vol. 69. №4. – P. 1419–1433.
25. Wildt D.E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation / D.E. Wildt // *ILAR J.* – 2000. – Vol. 41. №4. – P. 228–234.
26. Zemanova M.A. Noninvasive Genetic Assessment Is an Effective Wildlife Research Tool When Compared with Other Approaches / M.A. Zemanova // *Genes (Basel)*. – 2021. – Vol. 12. №11. – P. 1672.
27. Волнистый А.А. Система единиц управления популяциями диких животных и генетические подходы для их выделения на примере благородного оленя в Беларуси / А.А. Волнистый, К.В. Гомель, П.А. Велигуров [и др.] // *Природные ресурсы*.