

УДК [599.742.712:591.526](571.61/64)

**НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ
И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ УЧАСТКОВ АМУРСКОГО ТИГРА
(*PANTHERA TIGRIS ALTAICA* TEMMINCK, 1844; FELIDAE, MAMMALIA)
В ЮГО-ЗАПАДНОМ ПРИМОРЬЕ**

А. Ю. Красненко, П. А. Сорокин

*Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН
Россия, 119071, Москва, Ленинский просп., 33
E-mail: annakrasnenko@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.06.14 г.

Неинвазивная оценка численности и индивидуальных участков амурского тигра (*Panthera tigris altaica* Temminck, 1844; Felidae, Mammalia) в Юго-Западном Приморье. – Красненко А. Ю., Сорокин П. А. – С использованием неинвазивных молекулярно-генетических методов проведена оценка численности изолированной группировки амурского тигра Юго-Западного Приморья с декабря 2011 по март 2012 г. Показана возможность применения ДНК, выделенной из экскрементов, крови и шерсти для оценки размеров и взаиморасположения индивидуальных участков амурского тигра.

Ключевые слова: амурский тигр, *Panthera tigris altaica*, неинвазивные генетические методы, оценка численности, микросателлиты.

Noninvasive population size estimation and a study of the home range of the Amur tiger (*Panthera tigris altaica* Temminck, 1844; Felidae, Mammalia) in the southwest Primorye. – Krasnenko A. Ju. and Sorokin P. A. – The population size of an isolated Amur tiger group in the southwest Primorye was estimated by applying noninvasive genetic methods from December, 2011 till March, 2012. The possibility of application of the DNA extracted from the faecal, blood and hair for individual identification and assessment of the size and overlap of home ranges is shown.

Key words: Amur tiger, noninvasive genetic methods, population size estimation, microsatellites.

ВВЕДЕНИЕ

Группировка амурского тигра Юго-Западного Приморья изолирована от группировок из Северного и Южного Сихотэ-Алиня антропогенным барьером между Владивостоком и Уссурийском (Микелл и др., 2014). Изучаемая территория ограничена на востоке и северо-востоке р. Раздольной, на западе – границей с КНР. Численность группировки составляет около 20 особей (Sugimoto et al., 2012), и непредсказуемые изменения окружающей среды или демографические изменения могут привести к ее вымиранию. Подсчитано, что риск вымирания небольшой изолированной группировки может возрасти от 5 до 95% при увеличении смертности в результате браконьерской деятельности от 4 до 8% (Kenney et al., 1995). В данной популяции неизбежны близкородственные скрещивания, повышающие риск возникновения инбридинговой депрессии (Sugimoto et al., 2012). Если говорить об особенностях структуры популяции, то стоит упомянуть, что тиграм свойственна полигамия и семейная территориальность. *Panthera tigris altaica* живет на индивидуальном участке, ведет одиночный образ жизни, но на участке самца могут обитать одна и более самок, т.е. образуется семейный участок контактирующих

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ

и территориально объединенных особей (Юдин, Юдина, 2009). В пределах участка обитания выделяются «ядра», где тигры находятся продолжительное время и где сосредоточены их постоянные маршруты (Юдаков, Николаев, 1987). Многие особенности использования амурскими тиграми пространства оставались неизвестными до появления новых методов исследования. Например, было показано, что особи могут совершать дальние (до 20 км) переходы за относительно короткий промежуток времени (около 8 ч) (Рожнов и др., 2010). Изучение биологии амурского тигра затруднено из-за невысокой плотности хищника и его скрытного образа жизни. Состояние данной популяции отслеживается с помощью ряда методов – тропления, спутниковой телеметрии с использованием GPS-ошейников и фотоловушек. В дополнении к этому мы применили неинвазивные генетические методы, основанные на анализе ДНК, выделенной преимущественно из экскрементов. Однако ДНК, выделенная из экскрементов, имеет недостатки, связанные с ее качеством и количеством. На качество ДНК влияет также время года сбора и возраст образцов (Рожнов и др., 2009). В исследовании на медведях (*Ursus arctos*) было показано, что ДНК, выделенная из образцов трехдневной давности, помещенных в сухие условия, обладает наилучшим качеством (Murphy et al., 2007). Таким образом, наиболее пригодными для выделения ДНК являются свежие образцы, собранные в сухое время года либо в зимний период при отрицательной температуре. Пилотное исследование, выполненное на бенгальских тиграх (*Panthera tigris tigris*) из различных зоопарков, показало принципиальную возможность идентифицировать животных по 10 микросателлитным локусам (Bhagavatula, Singh, 2006). С помощью микросателлитных маркеров были успешно проанализированы образцы экскрементов и составлены индивидуальные генетические профили 45 особей южноаравийского леопарда (*Panthera pardus nimr*) (Perez et al., 2006). Генетический мониторинг природных популяций с использованием образцов экскрементов проводился для медведей гризли (Mowat, Strobeck, 2000), барсуков (Wilson et al., 2003), волков (Creel et al., 2003), ирбисов (Janecka et al., 2008). Положительные стороны такого подхода заключаются в том, что он не требует поимки животного и что результаты генотипирования образцов с использованием микросателлитных локусов объективно отражают численность популяции. С помощью индивидуальной идентификации по ДНК, выделенной из экскрементов, возможна также оценка размеров и взаиморасположения индивидуальных участков животных. Исследование, проведенное на гориллах Габона, показало присутствие 8 семейных групп на изучаемой территории (Arandjelovic et al., 2010).

Целью данной работы являлось определение численности группировки Юго-Западного Приморья и оценка взаиморасположения и размеров индивидуальных участков амурского тигра на изучаемой территории.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования использовались 128 образцов экскрементов, 5 волос и 2 пробы крови со следов, собранных на территории Юго-Западного Приморья с декабря 2011 по март 2012 г. вдоль маршрутов передвижения животных. ДНК из экскрементов выделялась с помощью набора реактивов Qiagen stool kit (Qiagen,

США), ДНК из крови и шерсти – QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Для анализа ядерной ДНК использовали 9 микросателлитных локусов с праймерами: e7, fca304, fca43, e21b, pun935, fca5, fca161, fca91, fca441 (Menotti-Raymond et al., 1999; Karmacharya et al., 2011) и маркер пола на ген цинковых пальцев, помеченные флуоресцентными красками (Pilgrim et al., 2005). ПЦР проводили с помощью амплификаторов Bio-Rad Tetrad (Bio-Rad, США) в объеме 10 мкл, содержащем 20 – 50 нг ДНК, 1x SE-буфер для Hot Start Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), 2.5 ммоль MgCl₂, 200 мкмоль dNTPs, 0.5 ммоль каждого праймера и 1 единицу Hot Start Taq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия). Параметры ПЦР реакции были следующими: 1 цикл при 93°C – 3 мин, 10 циклов при 94°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 30 с, 20 циклов при 89°C – 15 с, 55°C – 61°C – 15 с, 72°C – 30 с, 1 цикл при 72°C – 30 мин. Длины микросателлитных фрагментов определяли на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3130 и ABI 3500 с добавлением стандарта длины Liz 500 и программы GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems, США). ПЦР со всеми праймерами повторяли 4 раза. Обобщенный генотип животных принимался, если гетерозиготные аллели повторялись дважды, а гомозиготные трижды. Индивидуальное распознавание и вычисление вероятности идентичности для неродственных животных P_{HW} и для сибсов P_{SIB} (Waits et al., 2001) проводили в программе Genesap (Wilberg, Dreher, 2004). Для тигров, идентифицированных более 3 раз, индивидуальные участки строили методом оценки по внешним точкам (Minimal Convex Polygon).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ДНК, пригодная для дальнейшего анализа, была успешно выделена из 80 образцов, что составило 60% от собранного материала. Значение индекса информативности полиморфизма микросателлитных локусов (PIC) варьировало от 0.360 до 0.655. Вероятность идентичности близкородственных особей $P_{SIB}(ID)$ и случайно выбранных из популяции животных $P_{HW}(ID)$ для всего набора локусов составила 0.0014 и 0.000001 соответственно. Таким образом, по данному набору локусов можно отличить особей, даже находящихся в прямом родстве, с вероятностью около 99%. В зимне-весенний период 2011 – 2012 гг. численность группировки амурского тигра составляла 16 особей, из них 9 самок и 7 самцов. В 2010 – 2011 гг. на значительно меньшей выборке образцов было идентифицировано 7 животных (4 самки и 3 самца) (Sorokin et al., 2011). Из 7 тигров, идентифицированных с февраля 2010 г. по февраль 2011 г., 5 были повторно обнаружены в 2011 – 2012 гг. Одно животное из этих двух выборок было отловлено и помечено ошейником с GPS-передатчиком. К сожалению, провести сравнение двух методов не удалось, так как ему принадлежали образцы, идентифицированные однократно. Согласно данным более раннего исследования (Sugimoto et al., 2012), численность данной группировки с 2000 по 2005 г. составляла 12 особей (7 самок, 5 самцов).

В нашей работе число генотипированных образцов для каждой особи варьировало от 1 до 16. По координатам точек сбора и их индивидуальной принадлежности мы установили пространственное распределение индивидуальных участков тех тигров, которым принадлежат эти образцы (рис. 1, 2). Показано совместное

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ

использование территории особями обоих полов. Высока степень перекрытия участков самцов и самок. Для самцов выявлено совместное использование территорий. Согласно нашим данным, участки обитания самцов (МСП) занимают площадь от 54.6 до 287.2 км² (см. рис. 1). Для одного из тигров площадь составила 419.8 км², наиболее вероятно, что это расселяющийся зверь. Участки обитания самок (МСП) занимают площадь от 4 до 17.3 км² (см. рис. 2). Среднее число образцов на особь было выше для самцов, чем для самок, что может объясняться более высокой территориальной активностью самцов по сравнению с самками. Для двух самок удалось построить участки обитания по координатам точек сбора образцов зимы 2010 – весны 2011 г. и зимы 2011 – 2012 гг. Размеры участков их обитания несколько отличаются в разные сезоны (например, для одной из самок – 31.7 км² и 9.9 км²), что говорит о возможности изменения границ участков обитания с течением времени. При сравнении расположения участков обитания тигрицы за 2 сезона обнаруживается их незначительное перекрытие.

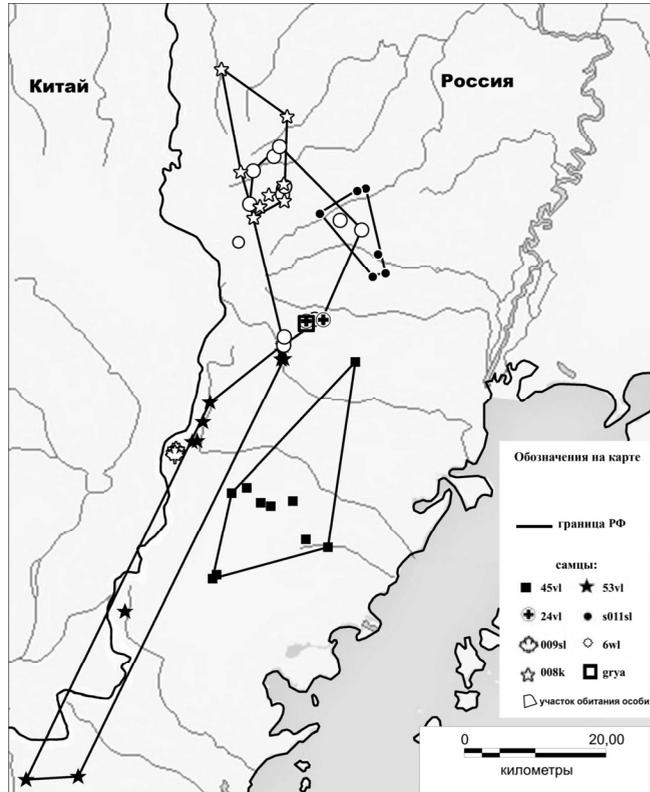


Рис. 1. Участки самцов, построенные с помощью метода оценки участка по внешним точкам (minimum convex polygon), по индивидуально определенным животным с февраля по май 2011 и с декабря 2011 по март 2012 г. Во врезке представлены номера проб, которыми обозначены индивидуальные животные

Эти данные подтверждаются исследованиями, проведенными в Уссурийском заповеднике, где было замечено, что расположение индивидуального участка обитания меняется в течение сезонов (Рожнов и др., 2011). В исследовании с использованием ошейников, снабженных GPS-передатчиками, размер участка обитания (МСП) тигров-самцов (от 197 до 817 км²) на территории Юго-Западного Приморья превышает размер участков самок (от 148 до 336 км²) (Эрнандес-Бланко, персо-

нальное сообщение). В нашей работе заниженные значения площадей по сравнению с данными по GPS-шейникам, вероятно, появляются из-за малого числа точек индивидуально определенных образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование показало принципиальную возможность использования неинвазивных молекулярно-генетических методов для оценки

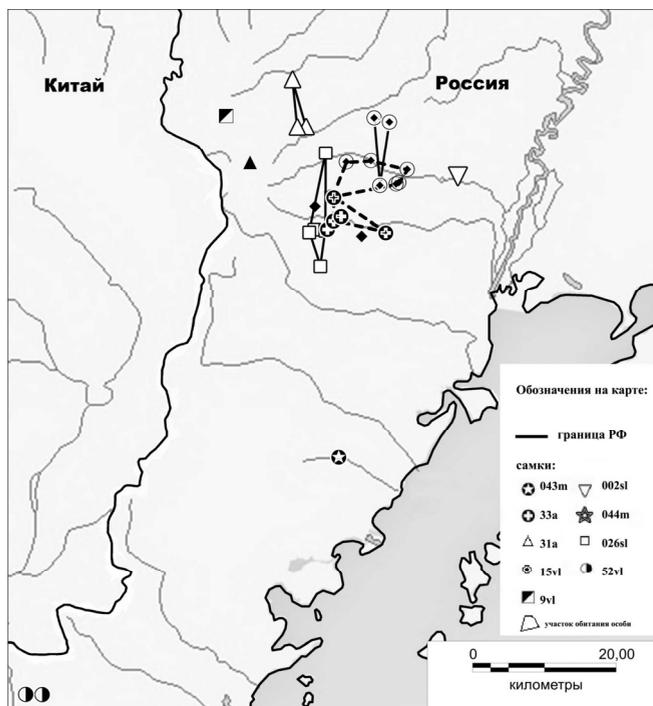


Рис. 2. Участки самок, построенные с помощью метода оценки участка по внешним точкам (minimum convex polygon), по индивидуально определенным животным с февраля 2010 г. по май 2011 г. и с декабря 2011 г. по март 2012 г. Во врезке представлены номера проб, которыми обозначены индивидуальные животные. Пунктиром обозначены участки обитания двух самок в 2010 – 2011 гг.

графического общества и гранта Президента Российской Федерации (проект № МК-4313.2014.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Микелл Д. Г., Рожнов В. В., Ермошин В. В., Мурзин А. А., Николаев И. Г., Эрнандес-Бланко Х. А., Найдено С. В. О возможном экологическом коридоре для крупных хищников

численности амурских тигров. Это позволит вносить коррективы при проведении учетов с использованием традиционных методов, таких как тропление по снегу. Помимо этого применение данной техники может помочь в выяснении размеров и взаиморасположения индивидуальных участков одновременно для всех животных, обитающих на определенной территории, что значительно сложнее выполнить с помощью других методов.

Авторы признательны В. В. Рожнову, К. К. Тарасян, В. С. Лукаревскому, С. В. Найдено, Х. А. Эрнандес-Бланко, С. В. Лукаревскому за всестороннюю помощь в работе

Работа выполнена при финансовой поддержке Русского Гео-

НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ И ИНДИВИДУАЛЬНЫХ

между Юго-Западным Приморьем и Сихотэ-Алинем // Ареалы, миграции и другие перемещения диких животных : материалы Междунар. науч.-практ. конф. / Тихоокеанский ин-т географии ДВО РАН. Владивосток, 2014. С. 199 – 210.

Рожнов В. В., Сорокин П. А., Найдено С. В., Лукаревский В. С., Эрнандес-Бланко Х. А., Литвинов М. Н., Котляр А. К., Юдин В. Г. Неинвазивная индивидуальная идентификация амурских тигров (*Panthera tigris altaica*) молекулярно-генетическими методами // Докл. РАН. 2009. Т. 429, № 2. С. 278 – 282.

Рожнов В. В., Эрнандес-Бланко Х. А., Лукаревский В. С., Найдено С. В., Сорокин П. А., Литвинов М. Н., Котляр А. К., Павлов Д. С. Применение спутниковых ошейников GPS-Argos для изучения пространства, используемого амурскими тиграми // Амурский тигр в Северо-Восточной Азии : проблемы сохранения в XXI веке : материалы Междунар. науч.-практ. конф. Владивосток : Дальнаука, 2010. С. 61 – 64.

Рожнов В. В., Эрнандес-Бланко Х. А., Лукаревский В. С., Найдено С. В., Сорокин П. А., Литвинов М. Н., Котляр А. К., Павлов Д. С. Использование спутниковых радиомаяков для изучения участка обитания и активности амурского тигра (*Panthera tigris altaica*) // Зоол. журн. 2011. Т. 90, № 5. С. 580 – 594.

Юдаков А. Г., Николаев И. Г. Экология амурского тигра. По зимним стационарным наблюдениям 1970 – 1973 гг. в западной части Среднего Сихотэ-Алиня. М. : Наука, 1987. 152 с.

Юдин В. Г., Юдина Е. В. Тигр Дальнего Востока России. Владивосток : Дальнаука, 2009. 485 с.

Arandjelovic M., Head J., Kuhl H., Boesch C., Robbins M. M., Maisels F., Vigilant L. Effective non-invasive genetic monitoring of multiple wild western gorilla groups // Biological Conservation. 2010. Vol. 143, № 7. P. 1 – 15.

Bhagavatula J., Singh J. Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation : A pilot study // BMC Genetics. 2006. Vol. 7, № 48. P. 1 – 12.

Creel S., Spong G., Sands J. L., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K. M., Smith D. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes // Molecular Ecology. 2003. Vol. 12, № 7. P. 2003 – 2009.

Janecka J. E., Jackson R., Yuquang Z., Diqiang L., Munkhtsog B., Buckley-Beason V., Murphy W. J. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples : a pilot study // Animal Conservation. 2008. Vol. 11. P. 401 – 411.

Karmacharya D. B., Thapa K., Shrestha R., Dhakal M., Janecka J. E. Noninvasive genetic population survey of snow leopards (*Panthera uncia*) in Kangchenjunga conservation area. Shey Phoksundo National Park and surrounding buffer zones of Nepal // BMC Research Notes. 2011. Vol. 4, № 516. P. 1 – 8.

Kenney J. S., Smith J. L. D., Starfield A. M., McDougal C. W. The long-term effects of tiger poaching on population viability // Conserv. Biol. 1995. Vol. 9. P. 1127 – 1133.

Menotti-Raymond M., David V., Lyons L. A., Schäffer A. A., Tomlin J. F., Hutton M. K., O'Brien S. J. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*) // Genomics. 1999. Vol. 57. P. 9 – 23.

Mowat G., Strobeck C. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis // J. of Wildlife Management. 2000. Vol. 64, № 1. P. 183 – 193.

Murphy A., Kendall K., Robinson A., Waits P. The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification // Conservation Genetics. 2007. Vol. 8. P. 1219 – 1224.

Perez I., Geffen E., Mokady O. Critically endangered Arabian leopards *Panthera pardus nimr* in Israel : estimating population parameters using molecular scatology // Oryx. 2006. Vol. 40, № 3. P. 295 – 301.

Pilgrim K. L., Mckelvey K. S., Riddle A. E., Schwartz M. K. Felid sex-identification based on noninvasive genetic samples // *Molecular Ecology Notes*. 2005. Vol. 5. P. 60 – 61.

Sorokin P. A., Rozhnov V. V., Naidenko S. V., Lukarevskiy V. S., Hernandez Blanco J. A. Use of non-invasive genetic methods for the assessment of kinship and level of genetic diversity in Amur tiger's groupings // *Sino-Russian symposium on Amur tiger. Conservation presentation abstract*. Hunchun, 2011. P. 2 – 3.

Sugimoto T., Nagata J., Aramilev V. V., McCullough D. R. Population size estimation of Amur tigers in Russian Far East using noninvasive genetic samples // *J. of Mammology*. 2012. Vol. 93, № 1. P. 93 – 101.

Waits L., Luikart G., Taberlet P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines // *Molecular Ecology*. 2001. Vol. 10. P. 249 – 256.

Wilberg M. J., Dreher B. P. GENECAP a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation // *Molecular Ecology Notes*. 2004. Vol. 4. P. 783 – 785.

Wilson G. J., Frantz A. C., Pope L. C., Roper T. J., Burke T. A., Cheeseman C. L., Delahay R. J. Estimation of badger abundance using fecal DNA typing // *J. of Applied Ecology*. 2003. Vol. 40. P. 658 – 666.