

Институт экологии растений и животных УрО РАН

ЭКОЛОГИЯ: ФАКТЫ, ГИПОТЕЗЫ, МОДЕЛИ

Материалы конференции молодых ученых,
посвященной 170-летию В.В. Докучаева
11–15 апреля 2016 г.



Екатеринбург

ЮШККИ

2016

УДК 574 (061.3)

Э 40

*Материалы конференции изданы при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований (№ 16-34-10069).*



Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы конф. молодых ученых, 11–15 апреля 2016 г. / ИЭРиЖ УрО РАН — Екатеринбург: Гощицкий, 2016 — 160 с.

В сборнике опубликованы материалы Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 170-летию В.В. Докучаева «Экология: факты, гипотезы, модели». Мероприятие проходило в Институте экологии растений и животных УрО РАН с 11 по 15 апреля 2016 г. Работы посвящены проблемам изучения биологического разнообразия на популяционном, видовом и экосистемном уровнях, этологии, анализу экологических закономерностей эволюции, поиску механизмов адаптации биологических систем к экстремальным условиям, а также популяционным аспектам экотоксикологии, радиобиологии и радиоэкологии.

В оформлении обложки использована фотография победителя фотоконкурса конференции С.Г. Мещерягиной «Приморские саванны».

ISBN 978-5-98829-051-3

© Авторы, 2016

© ИЭРиЖ УрО РАН, 2016

© Оформление. Издательство «Гощицкий», 2016

Оценка качества сохранности ДНК в музейных образцах тканей животных

П.А. Сибиряков¹, Л.И. Амерханова^{1,2}

¹ Институт экологии растений и животных УрО РАН, г. Екатеринбург

² Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург

Ключевые слова: выделение ДНК, музейные образцы, ПЦР, сохранность ДНК.

ВВЕДЕНИЕ

Музейные коллекции, ввиду богатого таксономического состава и обширного географического охвата, являются уникальным источником материала для молекулярно-генетических исследований. Именно благодаря музейным коллекциям становится возможным изучение динамики генетического разнообразия популяций животных с течением длительных (десятки лет) промежутков времени и генетический анализ вымерших популяций и таксонов (Hale et al., 2001; Martinkova, Searle, 2006). Однако музейные образцы часто остаются неисследованными в силу значительной трудоемкости и сложности методик выделения ДНК, что связано с ее постепенной деградацией в неоптимальных условиях хранения и контаминацией образцов средней ДНК (Martinkova, Searle, 2006).

Степень и скорость деградации ДНК зависят от многих факторов, в том числе от методов сбора материала, его фиксации, условий хранения, воздействия вредителей и т.д. (Gilbert et al., 2007; Thomsen et al., 2009). Хорошо известно влияние физических факторов на сохранность ДНК, в частности, температуры и влажности (Willerslev et al., 2004). Также последние исследования показали крайне негативное воздействие некоторых инсектицидов, применяемых для обработки коллекций, на сохранность ДНК в музейных образцах (Espeland, 2010). Таким образом, для оценки пригодности музейных образцов для дальнейших молекулярно-генетических исследований необходимо проведение оценки качества ДНК в музейных образцах, так как даже при успешном выделении ДНК, пригодной для последующего ПЦР-анализа, в образце могут отсутствовать фрагменты необходимой длины.

Цель данной работы – проведение оценки сохранности ДНК в образцах млекопитающих и жесткокрылых из коллекций зоологических музеев. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: 1) отработать методики выделения ДНК из

музейных образцов костной ткани и шкур млекопитающих, а также из музейных образцов жесткокрылых; 2) оценить количество и качества ДНК, сохраняющейся в музейных образцах млекопитающих и жесткокрылых; 3) составить рекомендации по хранению музейных образцов на основании анализа собственных и литературных данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для выполнения данной работы послужили препараты тотальной ДНК, выделенные в ходе проведения исследований в лаборатории филогенетики и биохронологии из образцов, входящих в зоологические коллекции музея ИЭРиЖ УрО РАН (г. Екатеринбург), а также личные коллекции сотрудников ИЭРиЖ УрО РАН и Сургутского госуниверситета. Проанализированы 532 препарата тотальной ДНК, выделенной из образцов, различных по срокам хранения и типу консервации (табл. 1).

Выбор методик выделения ДНК из различных образцов осуществляли по результатам анализа литературных данных и экспериментов, заключавшихся в комбинации различных способов получения лизата тканей, очистки раствора от примесей и иммобилизации ДНК из раствора. В качестве исходных использовали протоколы выделения ДНК, приведенные в следующих работах (Folmer, 1994; Su et al., 2003; Rohland, Hofreiter, 2007).

Таблица 1. Типы образцов, использованные для оценки качества сохранности ДНК

Группа	Типы тканей	Условия консервации	Сроки хранения (лет)	N	
Жесткокрылые: <i>Pterostichus oblongopunctatus</i> ; <i>Carabus nemoralis</i> ; <i>C. sibiricus</i>	целый жук, либо его конечности	96% этанол	0–1	21	
		сухой образец	2–45	37	
		живой	–	2	
Млекопитающие: <i>Microtus arvalis</i> ; <i>M. rossiaemeridionalis</i> ; <i>Sylvaemus flavicollis</i> ; <i>Pteromys volans</i>	печень	96% этанол	4–5	5	
		96% этанол	0–7	357	
	мышечная и хрящевая	хранение при температуре -80°C	10–17	22	
		сухой образец (погадки)	1–13	8	
		костная	сухой образец (после камеральной обработки, включая варку)	4–34	13
			шкура	сухой образец	2–43

Метод выделения считали пригодным для дальнейшей работы, если препараты тотальной ДНК были удовлетворительно чистыми по результатам спектрофотометрического анализа (соотношения поглощения УФ излучения на длинах волн 230, 260 и 280 нм) и если данным методом удавалось выделить пригодную для дальнейшего ПЦР-анализа ДНК (за исключением случаев, когда ПЦР-анализ не давал результатов в силу сильной фрагментации ДНК, что подтверждалось результатами анализа длины фрагментов ДНК, наблюдаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК).

Анализ сохранности ДНК проводили с использованием следующих критериев:

I — оценка количества ДНК, выделенной из образца. Количество ДНК, выделенной из образца, оценивалось методом спектрофотометрического анализа в нг/мкл, после чего производили пересчет полученного значения на объем элюирующего буфера для вычисления точного количества (мкг) ДНК, выделенной из каждого образца.

II — оценка качества сохранности ДНК. 1) оценка длины фрагментов, наблюдаемых при гель-электрофорезе препаратов тотальной ДНК; 2) проведение ПЦР на специфичные фрагменты длиной от ≈ 300 до ≈ 4800 пар оснований (п.о.).

Для проведения ПЦР на образцах жесткокрылых были выбраны следующие фрагменты: 1) участок гена *ND5* (мтДНК) длиной 1 065 п.о. с использованием праймеров VI.04 и VI.06 (Su et al., 2003); 2) участок гена *COI* (мтДНК) длиной 650 п.о. (праймеры LCO1490 и HCO2198) (Folmer, 1994).

Для проведения ПЦР на образцах млекопитающих были выбраны следующие фрагменты: 1) фрагменты, использованные для видовой идентификации видов-двойников обыкновенных полевок (Nerkutchenko et al., 1999) длиной 533 п.о. для *Microtus arvalis* и 447 п.о. для *M. rossiaemeridionalis*; 2) частичные и полные фрагменты гена цитохрома *b* с фланкирующими участками тРНК (мтДНК) (длиной от 300 до 1 200 п.о.) с использованием универсальных праймеров (Tougaard et al., 2007); 3) частичные последовательности мтДНК длиной $\approx 4\ 800$ п.о. (собственные праймеры).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация методов выделения ДНК. Каждый из использованных методов выделения ДНК представляет собой комбинацию различных подходов, используемых для получения лизата тканей, очистки раствора от примесей и иммобилизации ДНК из раствора. Описание использованных вариантов компоновки этапов выделения ДНК, а также типы образцов, для которых был использован тот или иной подход, даны в табл. 2.

Таблица 2. Методы выделения ДНК

Лизирующий буфер	Метод очистки ДНК	Метод иммобилизации ДНК из раствора	Типы образцов, для которых использовали данный метод, и степень успешности выделения	
			Успешно	Неуспешно
Протеиназа К, SDS	6М раствор NaCl		- мышечная и хрящевая ткани млекопитающих	- жесткокрылые; - ткани печени млекопитающих; - музейные образцы шкур млекопитающих
	смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт	преципитация этанолом или изопропанолом	- мышечная и хрящевая ткани млекопитающих; - такни печени млекопитающих; - образцы костной ткани млекопитающих; - жесткокрылые	-
	смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт и 6М раствор NaCl		- музейные образцы шкур млекопитающих	-
Протеиназа К, СТАВ	6М раствор NaCl pH=4	осаждение ДНК на поверхности силикатных частиц	- мышечная и хрящевая ткани млекопитающих; - музейные образцы шкур млекопитающих; - жесткокрылые	- ткани печени млекопитающих
	5М раствор GuSCN pH=4		- мышечная ткань млекопитающих; - образцы костной ткани млекопитающих	-
Протеиназа К, СТАВ	смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт	преципитация этанолом или изопропанолом	жесткокрылые	-
	смесь фенол-хлороформ-изоамиловый спирт и 6М раствор NaCl pH=4	осаждение ДНК на поверхности силикатных частиц	музейные образцы шкур млекопитающих	-

Все описанные методики позволяют выделять ДНК без примеси ингибиторов ПЦР и в достаточном количестве для дальнейшего ПЦР-анализа из всех типов образцов, для которых данный метод признан успешным (см. табл. 2).

Оценка количества выделенной ДНК. Для каждого образца тотальной ДНК была проведена оценка количества выделенной ДНК, средние, минимальные и максимальные значения по типам образцов приведены в табл. 3.

Таблица 3. Средние значения массы ДНК, получаемой при выделении из различных типов образцов

Тип образца	Масса образца, мкг	Масса ДНК, мкг				
		<i>N</i>	Использование силикатных частиц	Среднее ±О.С.	min.	max.
Мышечная и хрящевая ткани млекопитающих	5–10	261	нет	32.3±1.6	0.3	132.3
		155	да	13.6±0.6	1.3	35.9
Печень млекопитающих	5–10	5	нет	104.5±14.3	57.3	143.9
Шкура млекопитающих	5–50	21	нет	273.9±31.4	70	531.3
		46	да	22.9±1.1	4.5	34.5
Костная ткань млекопитающих	50–100	5	нет	40.5±20.3	3.5	113.6
		16	да	9.1±1.8	0.5	21.4
Целый жук либо его конечности	5–30	35	нет	11.3±1.2	4.2	29.5
		25	да	5.4±0.5	1.8	12.6

Показано, что использование методов выделения, включающих этап иммобилизации ДНК на силикатных частицах, приводит к уменьшению общего количества ДНК, выделенной из образца по сравнению с методами, включающими этап преципитации ДНК из раствора с использованием этилового и изопропилового спиртов (см. табл. 3), что связано с ограниченной емкостью силикатных частиц, которая может быть увеличена за счет их добавления в большем количестве. Более детально применение данного подхода рассмотрено в следующей работе (Rohland, Hofreiter, 2007). Однако использование силикатных частиц для иммобилизации ДНК позволяет избежать использования высокотоксичной смеси фенола-хлороформа-изоамилового спирта и делает данный метод более безопасным.

При сравнении количества ДНК, выделенной из различных типов образцов, видно, что при работе с тканями млекопитающих, наибольшее количество ДНК экстрагируется из тканей печени и шкур,

а наименьшее — из образцов костной ткани (при учете массы образца, из которого проводилось выделение ДНК). Отдельно стоит отметить достаточно низкое количество ДНК, успешно выделяемой из образцов насекомых, что может быть связано с тем фактом, что значительную часть образца по массе в данном случае составляет хитиновый экзоскелет.

Оценка качества выделенной ДНК. Помимо оценки количества ДНК, выделяемой из образцов, важно адекватно оценить качество полученной ДНК, а точнее — длину фрагментов ДНК, доступных для амплификации. Нами использованы два критерия: 1) оценка длины фрагментов, наблюдаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК; 2) успешность проведения ПЦР фрагментов различной длины.

При оценке длины фрагментов, наблюдаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК, было показано, что наилучшая сохранность ДНК наблюдается в мышечной ткани млекопитающих, фиксированной в 96%-ном этаноле, либо хранившаяся в замороженном состоянии при температуре -80°C . В подобных образцах всегда присутствует фракция высокомолекулярной ДНК ($>20\ 000$ п.о.) независимо от срока хранения (от 0 до 7 лет при фиксации в 96%-ном этаноле, и от 10 до 17 лет при хранении при температуре -80°C).

Однако наибольший интерес при оценке качества сохранности ДНК представляют те типы образцов, для которых удалось получить данные по сохранности ДНК на протяжении длительных сроков хранения, в частности, костная ткань и шкуры млекопитающих, а также образцы жесткокрылых. Анализ результатов электрофореза препаратов тотальной ДНК позволил построить графики, отражающие степень сохранности ДНК в данных типах образцов в зависимости от срока хранения, которые представлены на рисунке.

Высокомолекулярная ДНК ($>20\ 000$ п.о.) была выделена из образцов костной ткани сроком хранения до 9 лет (см. рисунок, А), хотя при этом часть образцов содержала только деградированную ДНК ($\approx 5\ 000$ п.о. и короче в образцах сроком хранения 4 года). В образцах сроком хранения 12 лет максимальная длина фрагментов ДНК, наблюдаемой при электрофорезе препаратов тотальной ДНК, варьировала от 2 000 до 5 000 п.о. Наименьшая максимальная длина сохранившихся фрагментов ДНК была обнаружена в образцах сроком хранения 34 года (≈ 500 п.о.).

Анализ длины фрагментов ДНК, сохранившейся в образцах жесткокрылых (см. рисунок, Б), показал, что высокомолекулярная ДНК ($>20\ 000$ п.о.) присутствовала только в образцах сроком хранения до двух лет. Также в ряде образцов аналогичного срока хранения (0–2 года) сохранилась только фрагментированная ДНК длиной менее 800 п.о. В свою очередь, электрофорез препаратов тотальной ДНК из

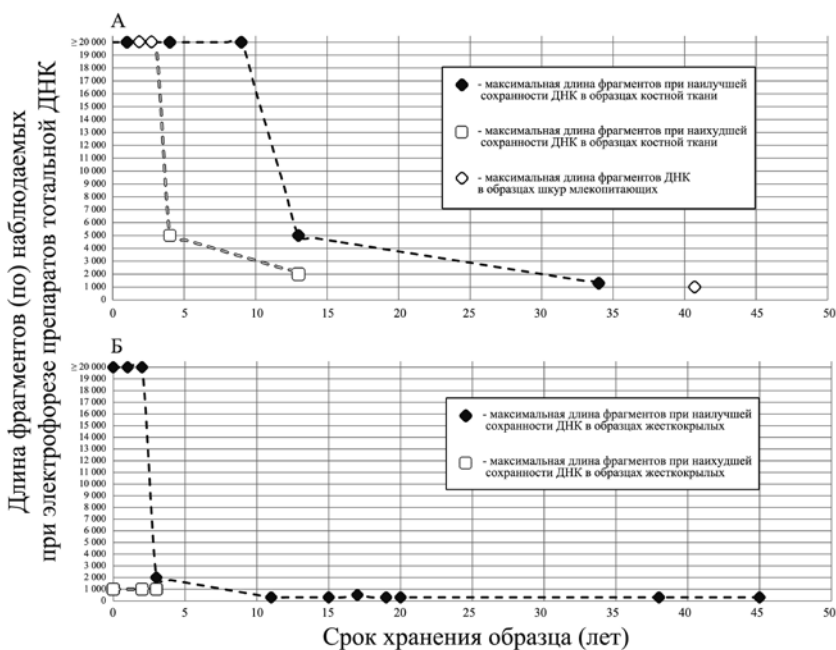


Рисунок. Диапазон максимальных значений длин фрагментов ДНК, получаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК. А — образцы костной ткани и шкур млекопитающих; Б — образцы жесткокрылых.

образцов сроком хранения от 11 до 38 лет показал наличие в образцах только фрагментированной низкомолекулярной ДНК (≈ 500 п.о. и менее).

Наблюдаемое варьирование максимальной длины сохранившихся фрагментов ДНК в образцах одинакового срока хранения (особенно в образцах жесткокрылых сроком хранения 0–2 года), может быть объяснено воздействием дополнительных факторов, в том числе условиями хранения или предварительной обработкой данных образцов перед помещением их в музейные коллекции. В случае с костным материалом, это может быть обусловлено особенностями камеральной обработки, а в случае с образцами жесткокрылых — с неучтенными при анализе сохранности ДНК методиками отлова и консервации образцов, а также с изолирующими свойствами хитинового экзоскелета, нарушающими быстрое высыхание образца или поступление фиксатора в ткани, в результате чего мягкие ткани, содержащие основную часть доступной для выделения ДНК, начинают разлагаться естественным путем.

Оценка длины фрагментов, доступных для амплификации, в препаратах тотальной ДНК, выделенных из различных по срокам хранения образцов тканей, показала результаты аналогичные анализу максимальных длин фрагментов, наблюдаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК. Все образцы мышечной ткани, как фиксированные в 96%-ном этаноле, так и хранившиеся при температуре -80°C , содержат ДНК, пригодную для амплификации фрагментов длиной до $\approx 4\ 800$ п.о. включительно. Результаты анализа качества сохранности ДНК в образцах различного срока хранения для костной ткани и шкур млекопитающих, а также для образцов жесткокрылых приведены в табл. 4.

Полученные результаты согласуются с результатами анализа максимальных длин фрагментов, наблюдаемых при электрофорезе препаратов тотальной ДНК. В частности, образцы из остеологических коллекций и шкур млекопитающих содержат более качественную ДНК по сравнению с образцами жесткокрылых. Максимальный возраст сухого образца насекомого, при амплификации которого был получен фрагмент длиной ≈ 1100 п.о. составил 3 года. В целом, доля образцов жесткокрылых, для которых была проведена успешная амплификация фрагментов той или иной длины, ниже, чем в случае с тканями млекопитающих, что может быть связано с более быстрыми темпами разложения ДНК в образцах насекомых и наличием дополнительных способствующих этому факторов.

Таблица 4. Успешность амплификации фрагментов разной длины из образцов различного срока хранения (отношение числа образцов, для которых фрагмент амплифицирован успешно, к общему числу образцов, на которых проводили амплификацию фрагмента)

Длина амплифицируемых фрагментов, п.о.	300–500	500–750	1 000–1 200	4 800	300–500	500–750	1 000–1 200	4 800
Срок хранения	0–2 года				3–5 лет			
Шкура	1/1	1/1	–	–	26/26	13/14	7/12	–
Кость	1/1	–	1/1	–	–	5/5	5/5	–
Насекомые	–	21/43	20/45	–	–	1/1	1/2	–
Срок хранения	9–20 лет				34–45 лет			
Шкура	–	–	–	–	8/40	3/8	0/21	–
Кость	7/9	–	6/6	3/3	–	0/6	0/6	–
Насекомые	–	0/5	0/5	–	–	0/2	0/2	–

Воздействие физико-химических факторов на сохранность ДНК.

Срок хранения хоть и оказывает влияние на качество сохранности ДНК, но не является единственным фактором, способствующим деградации ДНК в образцах. Однако зачастую не представляется возможным произвести учет всех факторов, оказавших воздействие на образец с момента его сбора до момента его взятия из коллекции для последующего молекулярно-генетического анализа. При этом использование в молекулярно-генетических исследованиях образцов, изначально для этого не предназначенных, в настоящее время происходит довольно часто и существует необходимость создания максимально благоприятных условий для сохранения ДНК в подобных образцах. На основании анализа собственных и литературных данных нами были рассмотрены особенности воздействия различных физико-химических факторов на сохранность ДНК, а также составлены общие рекомендации по хранению музейных образцов тканей животных (не предназначенных изначально для молекулярно-генетического анализа), которые могут способствовать снижению воздействия на ДНК неучтенных физико-химических факторов, способствующих её деградации, что оставляет данные коллекции потенциально-пригодными для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Химические агенты, широко применяемые как для фиксации образцов, так и для обработки музейных коллекций от паразитов (такие как, формалин, дихлофос и т.д.), оказывают негативное влияние на сохранность ДНК, вызывая её ускоренную фрагментацию, различные изменения структуры и появление химерных последовательностей (Hale et al., 2001; Gilbert et al., 2007; Thomsen et al., 2009). Кроме того, химические препараты способны выступать в роли ингибиторов ПЦР и требуют специализированных методик для работы с образцами, подверженными их воздействию (Espeland, 2010).

Воздействие физических факторов на сохранность ДНК также достаточно широко изучено (Willerslev et al., 2004), в частности, хорошо известно влияние на сохранность ДНК температурных факторов, влажности и т.д. В кратком виде особенности воздействия на ДНК различных физических факторов среды представлены в табл. 5.

Исходя из вышеперечисленных особенностей воздействия различных физико-химических факторов на сохранность ДНК, в табл. 6 нами приведены краткие рекомендации по сбору и хранению образцов тканей животных, изначально не предназначенных для дальнейшего молекулярно-генетического анализа, которые могут способствовать снижению воздействия дополнительных факторов на скорость деградации ДНК.

Таблица 5. Воздействие физических факторов среды на сохранность ДНК(по: Lindahl, 1993; Dillon et al.,1996; Willerslev et al., 2004)

Фактор	Воздействие на ДНК	Эффект
Температура	Фрагментация ДНК	Темпы распада ДНК замедляются на порядок при понижении температуры на каждые 10°С
Влажность	Гидролитические повреждения одно- и двух цепочечной ДНК	В гидратированной ДНК при 37°С фосфодиэфирное расщепление происходит примерно 1 раз каждые 2.5 ч, а депуринизация и β-элиминация – 1 раз каждые 10 ч
Свободные радикалы (-O ₂ ·; -ОН), а также перекись водорода (H ₂ O ₂)	Окислительные повреждения отдельных нуклеотидов	Блокировка работы ДНК полимеразы и возникновение химерных последовательностей при секвенировании

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптимизированы методики выделения ДНК из музейных образцов костной ткани и шкур млекопитающих, а также образцов жесткокрылых, базирующиеся на комбинации различных подходов, используемых для получения лизата тканей, очистки раствора от примесей и иммобилизации ДНК из раствора. Все описанные методики позволяют выделять ДНК без примеси ингибиторов ПЦР и в достаточном количестве для дальнейшего ПЦР анализа из всех типов образцов, для которых данный метод был признан успешным. Показано, что для образцов тканей млекопитающих (костная ткань, шкуры) характерно более высокое содержание ДНК, а также меньшая скорость её деградации с течением времени, чем в образцах жесткокрылых, что может быть связано как с воздействием агрессивных химических агентов на образцы жесткокрылых при их отлове и хранении, так и с естественным разложением тканей внутри экзоскелета. На основании анализа собственных и литературных данных рассмотрено влияние различных физико-химических факторов на сохранность ДНК и предложены рекомендации по сбору и хранению музейных образцов тканей животных, потенциально пригодных для молекулярно-генетического анализа.

Авторы выражают благодарность д.б.н. Бородину А.В. и к.б.н. Марковой Е.А. за помощь в обсуждении и интерпретации результа-

Таблица 6. Рекомендации по сбору материала, камеральной обработке и хранению музейных образцов

Этап	Жесткокрылые	Млекопитающие
Сбор материала	Указывать способ отлова и умерщвления объектов, в частности – применяемые химические препараты, а также данные о том, в течение какого времени образцы были подвержены их воздействию. При этом воздействие химических агентов должно быть минимизировано по времени и концентрациям	Для недопущения разложения тканей образцов, вызывающего ускоренную деградацию ДНК, необходимо проводить консервацию образцов в максимально короткие сроки с момента взятия ткани, либо умерщвления животного
Камеральная обработка	Во избежание разложения тканей образцов, вызывающего ускоренную деградацию ДНК, образцы необходимо максимально быстро просушить в проветриваемом месте, либо фиксировать образцы в неагрессивном фиксаторе, например, 96%-ном этаноле	Во избежание негативного воздействия на сохранность ДНК не рекомендуется длительное кипячение или мацерация образцов остеологических коллекций с использованием агрессивных химических агентов для дополнительной очистки от остатков мягких тканей. В случае необходимости создания «влажного» препарата оптимальным является использование неагрессивных фиксаторов, например, 96%-ного этанола
Хранение коллекций	Хранение музейных образцов рекомендуется в сухих прохладных условиях. При обработке коллекций от паразитов необходимо избегать применения любых химических препаратов в неоправданно высоких концентрациях, наиболее оптимальным является применение нетоксичных методов борьбы с паразитами, таких как заморозка или помещение образцов в бескислородную среду.	

тов; Ерохину Н.Г., к.б.н. Зиновьеву Е.В., к.б.н. Ялковской Л.Э., к.б.н. Старикову В.П. и Некрасову Е.А. за предоставленный материал, использованный в ходе выполнения работы.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (проекты № 16–04–01625а и № 16–04–01486а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dillon N., Austin A.D., Bartowesky E.* Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects // *Insect Molecular Biology*. 1996. V. 5. № 1. P. 21–24.
- Espeland M., Irestedt M., Johanson K.A.* et al. Dichlorvos exposure impedes extraction and amplification of DNA from insects in museum collections // *Frontiers in Zoology*. 2010. V. 7. № 2.
- Folmer O., Black M., Hoeh W.* DNA primers for the amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit *I* from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. V. 3. P. 294–299.
- Gilbert M., Moore W., Melchior L., Worobey M.* DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage // *PLoS ONE*. 2007. I. 3. P. e272.
- Hale M.L., Lurz P.W., Shirley M.D.* et al. Impact of landscape management on the genetic structure of red squirrel populations // *Science*. 2001. V. 293. № 5538. P. 2246–2248.
- Lindahl T.* Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature*. 1993. № 362. P. 709–715.
- Martinkova N., Searle J.B.* Amplification success rate of DNA from museum skin collections: a case study of stoats from 18 museums // *Molecular Ecology Notes*. 2006. V. 6. № 4. P. 1014–1017.
- Nekrutenko A., Makova K.D., Chesser R.K., Baker R.J.* Representational difference analysis to distinguish cryptic species // *Molecular ecology*. 1999. V. 8. № 7. P. 1235–1237.
- Rohland N., Hofreiter M.* Ancient DNA extraction from bones and teeth // *Nature Protocols*. 2007. V. 2. № 7. P. 1756–1762.
- Su Z-H., Imura Y., Kim C-K.* et al. Phylogenetic relationships in the division Lipastomorphi (Coleoptera, Carabidae) of the world as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences // *Genes Genet. Syst.* 2003. № 78. P. 37–51.
- Thomsen P.F., Elias S., Gilbert M.* et al. Non-Destructive Sampling of Ancient Insect DNA // *PLoS ONE*. 2009. V. 4. I. 4. P. e5048.
- Tougaard C., Brunet-Lecomte P., Fabre M., Montuire S.* Evolutionary history of two allopatric *Terricola* species (Arvicolinae, Rodentia) from molecular, morphological, and palaeontological data // *Biological Journal of the Linnean Society*. 2007. V. 93. P. 309–323.
- Willerslev E., Hansen A.J., Poinar H.N.* Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost // *Trends. Ecol. Evol.* 2004. V. 19. I. 3. P. 141–147.