

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

Объект авторского права

УДК 575.174.015.3:343.983.7

ГРЕБЕНЧУК
Александра Евгеньевна

**АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА В
СЕМЕЙСТВЕ ПСОВЫЕ (*CANIDAE*) ДЛЯ РЕШЕНИЯ СУДЕБНО-
ЭКСПЕРТНЫХ ЗАДАЧ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Минск, 2026

Научная работа выполнена в Государственном учреждении «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» и Белорусском государственном университете

Научный
руководитель: **Цыбовский Иосиф Станиславович,**
кандидат биологических наук, ведущий специалист
сектора учебно-методической работы управления
кадровой и учебно-методической работы
РУП «БелЮрОбеспечение»

Официальные
оппоненты: **Урбанович Оксана Юрьевна,**
доктор биологических наук, профессор, заведующий
лабораторией молекулярной генетики
Государственного научного учреждения «Институт
генетики и цитологии НАН Беларуси»

Гайдученко Елена Сергеевна,
кандидат биологических наук, доцент, заведующий
лабораторией ихтиологии Государственного научно-
производственного объединения «Научно-
практический центр НАН Беларуси по биоресурсам»

Оппонирующая
организация: Государственное научное учреждение «Институт леса
Национальной академии наук Беларуси»

Защита состоится « 04 » июня 2026 г., в 10.30 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при Государственном научном учреждении «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: o.orlovskaya@igc.by, тел.: (+375-17) 305 34 10; факс: (+375-17) 378 19 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан « 24 » апреля 2026 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат биологических наук, доцент



О.А. Орловская

ВВЕДЕНИЕ

Семейство Псовые (*Canidae*) является ключевым звеном в нише хищников в Беларуси. Псовые представлены свободно живущими видами – волком евразийским (*Canis lupus lupus*); рыжей морфой лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*); собакой енотовидной (*Nyctereutes procyonoides*), единичными экземплярами шакала золотистого (*Canis aureus*); в зверохозяйствах содержатся вид песец обыкновенный (*Vulpes lagopus*) и черно-бурая морфа лисицы обыкновенной. Самым многочисленным является подвид волка – собака домашняя (*Canis lupus familiaris*).

Определяющее значение в динамике популяций различных диких видов стало основанием для отнесения диких псовых к категории ненормируемых видов [Указ Президента Республики Беларусь от 21.03.2018 г. № 112]. Интенсивные отстрелы вкупе с антропогенной фрагментацией ландшафтов требуют объективной научной оценки генетического состояния популяций для прогнозирования устойчивого развития экосистем [Moore et al., 2021]. В отношении волка имеется реальная угроза генетической интрогрессии генов одичавших собак в генофонд волка с возможным влиянием на долгосрочную жизнеспособность дикого вида. Собака домашняя может быть задействована и в событиях социального характера, например, нападения на людей и др.

Правонарушения в отношении объектов животного мира являются обычным явлением во всем мире: криминалистический ДНК-анализ объектов животного происхождения продолжает стремительно развиваться [Rębała et al., 2022; Wostenberg, Burnham-Curtis, 2023; Hill et al., 2022].

Доказательственную силу криминалистическому ДНК-анализу обеспечивает его включение составной частью (судебная экспертиза) в национальную правовую систему, что требует достоверности и воспроизводимости приемов и методов, которые могут быть достигнуты на основе научного исследования генофондов и фундаментальных процессов, протекающих в них. На сегодняшний день комплексный детальный популяционно-генетический анализ представителей семейства Псовые, обитающих и разводимых в Беларуси, не проводился.

Для представителей семейства Псовые отсутствуют криминалистические панели для проведения идентификационных исследований, нет технологичного и доступного метода ДНК-идентификации видов, а в случае волка – и подвидов.

Таким образом, актуальность настоящего исследования заключается в комплексном исследовании генетического полиморфизма и генетической структуры видов семейства Псовые и приоритетной разработке технологий и методического инструментария для ДНК-дифференциации видов (подвидов) и криминалистической идентификации конкретных особей псовых.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Диссертационная работа выполнена в рамках реализации Плана научных исследований и разработок общегосударственного, отраслевого назначения, направленных на научно-техническое обеспечение деятельности Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь: научно-исследовательская работа «Разработка методик криминалистической идентификации видов и особей в семействе Псовые на основе изучения генетического STR-полиморфизма» (№ ГР 20190195, 2019–2020 гг.), а также в рамках научных стажировок, финансируемых проектом MOST (Mobility Scheme for Targeted People-to-People-Contacts / Программа мобильности для целенаправленных межличностных контактов), в Университете Эдинбурга (№ заявки: R-z5zn-42143, 2018 г.) и в Венском университете ветеринарной медицины (№ заявки: R-0PJH-51958, 2019 г.).

Научные положения диссертационной работы соответствуют пунктам 3. «Биологические системы и технологии»; 10. «Экология и природопользование» и 13. «Безопасность человека, общества и государства» приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 гг., утвержденных постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 № 190 и приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., отраженным в пунктах 2. «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», 3. «Энергетика, строительство, экология и рациональное природопользование» и 6. «Обеспечение безопасности человека, общества и государства» Указа Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156.

Цель диссертационного исследования – оценить генетический полиморфизм и структуру популяций представителей семейства Псовые, на основе полученных результатов разработать технологии межвидовой ДНК-дифференциации видов (подвидов) и внутривидовой идентификации отдельных особей волка евразийского, собаки домашней, собаки енотовидной и лисицы обыкновенной и создать методическое и информационно-справочное обеспечение для использования в судебной экспертизе объектов животного происхождения.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить перечень STR-локусов для ДНК-генотипирования волка евразийского, собаки домашней, собаки енотовидной и лисицы обыкновенной.
2. Исследовать внутривидовой и межвидовой полиморфизм аутосомных STR-локусов представителей семейства Псовые.
3. Установить генетическую структуру и уровень генетической гомогенности современных белорусских популяций псовых по аутосомным STR-локусам как источника сведений о генетическом разнообразии.

4. Провести оценку вариабельности количества копий гена альфа-амилазы (*Amy2b*) у диких и домашнего представителей семейства Псовые и изучить возможность использования результатов в ДНК-дифференциации волка евразийского, собаки домашней и гибридных особей этих подвидов.

5. Разработать технологии ДНК-дифференциации волка евразийского, собаки домашней, собаки енотовидной и лисицы обыкновенной, а также технологию внутривидовой ДНК-идентификации псовых.

6. Разработать методики судебно-экспертной ДНК-идентификации биологических образцов представителей семейства Псовые, обитающих и разводимых в Беларуси, видовой дифференциации и методику дифференциации волка евразийского и собаки домашней.

7. Для всех видов псовых создать информационно-справочное обеспечение для использования в судебной экспертизе при установлении вида (подвида) животного, проведении идентификационного исследования и установлении вероятности биологического родства.

Объектом исследования являлись образцы ДНК ($n = 1\ 043$) представителей семейства Псовые, обитающих и разводимых в Беларуси: волка евразийского, собаки домашней, рыжей (дикой) и черно-бурой (фермерской) морф лисицы обыкновенной, песца обыкновенного, собаки енотовидной и гибридных особей волка евразийского и собаки домашней (*Canis lupus*), а также выборки лисицы обыкновенной из Шотландии, образцов волка евразийского из Австрии, шакала золотистого (*Canis aureus*), красного волка (*Cuon alpinus*), гиеновидной собаки (*Lycan pictus*) и дикой собаки Динго (*Canis lupus Dingo*).

Предметом исследования являлся аллельный полиморфизм аутомсомных STR-локусов и вариабельность количества копий гена альфа-амилазы (*Amy2b*) при ДНК-генотипировании волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной и собаки енотовидной.

Научная новизна. Впервые в Беларуси проведено комплексное исследование популяций диких и домашних псовых с использованием 70 STR-локусов и гена *Amy2b*, анализ генетического разнообразия и генетической структуры белорусских популяций волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной и собаки енотовидной и оптимизированы панели STR-локусов для изучения популяционно-генетической структуры каждого исследуемого вида.

Впервые на территории стран СНГ разработаны, валидированы и внедрены в практику инновационные технологии экспертного ДНК-генотипирования псовых, включающие тест-системы для идентификации особей (волк евразийский / собака домашняя, лисица обыкновенная, собака енотовидная), тест-систему для дифференциации видов псовых и тест-систему ДНК-дифференциации волка евразийского и собаки домашней, включая идентификацию гибридных особей первого поколения.

Разработаны и внедрены в судебно-экспертную практику методики межвидовой и внутривидовой ДНК-идентификации биологических образцов видов семейства Псовые. Разработаны информационно-статистические комплексы для автоматизированного анализа генетических данных каждого вида. Впервые в судебной экспертизе рассчитаны коэффициенты подразделенности популяций (θ -value) с учетом инбредных и гибридных особей, необходимые для оценки значения уровня достоверности идентификационного исследования.

Впервые в Беларуси и на территории стран СНГ проведено системное исследование генетического полиморфизма представителей семейства Псовые и разработка методического инструментария для его применения в криминалистических исследованиях образцов с мест правонарушений.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белорусская природная популяция волка евразийского характеризуется гомогенно распределенным по территории высоким уровнем генетического разнообразия (средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составили 0,730 и 0,786, соответственно) и наличием мутационно-дрейфового равновесия, типичного для панмиктической модели развития. Внутренняя консолидированность генофондов волка и собаки и их существенные различия между собой позволяют, с одной стороны, отслеживать потоки генов между подвидами, что подтверждается обнаруженной интрогрессией гена *Amy2b* собак домашних в генофонд волка евразийского (частота 6,36 %), с другой стороны, создают научную основу для разработки методов дифференциации образцов в криминалистических исследованиях.

2. Показатели генетического полиморфизма лисицы обыкновенной на территории Беларуси свидетельствуют о высоком генетическом разнообразии вида, отсутствии субпопуляционной подразделенности, а также ее принадлежности к единой европейской популяции (процент вариаций между белорусской и шотландской выборками не превышает 4,64 %). При наличии существенной дифференциации генофондов дикой и фермерской морф лисицы (процент вариаций между выборками 27,44 %) генетическая интрогрессия между ними не выявлена, что указывает на отсутствие угрозы генетической целостности дикого вида.

3. Оптимальные параметры генетического разнообразия еотовидной собаки (средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности 0,665 и 0,670, соответственно; субпопуляционный индекс фиксации аллелей 0,0148) свидетельствуют о существовании единой популяции на всей занимаемой территории с естественным развитием и высоким уровнем панмиксии. Выявленное сходство по исследованным параметрам с еотовидной собакой, обитающей в Литве, указывает на принадлежность еотовидной собаки, распространенной в Беларуси, к центральноевропейской популяции.

4. Оригинальная панель из 6 STR-локусов, сформированная на основе анализа межвидового генетического полиморфизма массивов генотипов волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной, енотовидной собаки и песца обыкновенного, обладает выраженным межвидовым дифференцирующим потенциалом, достаточным для определения видового происхождения образцов в группе генетически близкородственных псовых, а в совокупности с установленным достоверным различием численного значения количества копий гена *Amy2b* у диких и домашних псовых – для различения подвидов волка и собаки.

5. Разработанный впервые на территории стран СНГ комплекс из 8 методик для криминалистического ДНК-генотипирования представителей семейства Псовые с автоматизированным расчетом результатов генотипирования, реализуемых на базе 5 специализированных тест-систем (CPlex, NPlex, VPlex, CDPLex и Canis-RT), создает возможность достоверного установления видовой, подвидовой, половой принадлежности и индивидуального тождества животных с минимальными рисками экспертных ошибок субъективного характера.

Личный вклад соискателя ученой степени в результаты диссертации. Соискатель принимал непосредственное участие в формировании коллекции ДНК. Автором диссертационной работы лично проведен анализ литературы, подбор информативных STR-локусов, оптимизация условий классической ПЦР, цифровой капельной ПЦР (ddPCR) и количественной ПЦР (кПЦР) и конструирование тест-систем, получены и систематизированы экспериментальные данные, осуществлен их генетико-статистический анализ. На основе результатов исследования соискателем разработаны методические рекомендации по проведению ДНК-идентификации и ДНК-дифференциации представителей семейства Псовые, информационно-статистические комплексы для анализа генетических данных, под редакцией научного руководителя подготовлены научные публикации и заявки на получение патентов.

Подготовка рукописи диссертации выполнена автором лично при консультации научного руководителя, кандидата биологических наук И.С. Цыбовского, за что автор выражает искреннюю благодарность. Автор признателен сотрудникам РГОО «Белорусское общество охотников и рыболовов», зверохозяйств Республики Беларусь, ветеринарного центра «Друг», сотрудникам ГУ «Минская городская ветеринарная станция» и ГПНИУ «Полесский государственный радиационно-экологический заповедник» за помощь в формировании коллекции биологических образцов. Также автор выражает благодарность за ценные советы и сотрудничество заведующему кафедрой консервативной генетики Королевской школы ветеринарных наук Университета Эдинбурга, доктору биологических наук Роберту Огдену, заведующему лабораторией молекулярной генетики факультета интегративной биологии и эволюции Института экологии дикой природы Венского университета

ветеринарной медицины, доктору биологических наук Стивену Смигу, а также всем соавторам опубликованных работ за обсуждение данных при их написании.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 8 международных научных и научно-практических конференциях: 1st International Caparica Conference in Translational Forensics (Caparica, 2017), международном научном семинаре «DNA profiling techniques in Wildlife Forensic» (Edinburgh, 2018), 4th Annual Meeting in Conservation Genetics (Frankfurt am Main, 2020), 38th International Society for Animal Genetics Conference, Virtual (Cape Town, 2021), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Теория и практика фундаментальных и прикладных исследований в сфере судебно-экспертной деятельности и ДНК-регистрации населения Российской Федерации» (Уфа, 2021), III международной научно-практической конференции «Судебная экспертиза: теория и практика в современных условиях» (Минск, 2023), 39th International Society for Animal Genetics Conference (Cape Town, 2023) и конференции «Методы судебной генетики 2023» (Москва, 2023).

По результатам диссертационного исследования получено два патента на изобретение, издано 8 методик, которые включены в Реестр методических материалов в сфере судебно-экспертной деятельности Государственного комитета судебных экспертиз и успешно применяются в судебно-экспертной практике Республики Беларусь.

Опубликованность результатов диссертации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 28 печатных работ (общий объем – 14,66 авторских листов): 5 статей в научных журналах, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, объемом 4,04 авторских листа, 10 публикаций в других журналах и сборниках материалов конференций и 3 тезисов докладов. Отдельными изданиями опубликованы 8 методик для практикующих судебных экспертов, объемом 9,07 авторских листов и получено два патента на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста, состоит из введения, общей характеристики работы, шести глав, заключения, списка использованных источников (225 литературных источников и 28 публикаций соискателя) и шести приложений. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 28 таблицами общим объемом 29 страниц.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Обзор литературы

В главе дано описание современного состояния популяций псовых в Республике Беларусь, охарактеризованы основные подходы для изучения

внутри- и межвидового генетического полиморфизма семейства и дана оценка применимости этих подходов в генетическом мониторинге популяций и судебной экспертизе объектов животного происхождения.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования. В работе использовали коллекцию (период сбора 2018–2022 гг.) биологического материала псовых ($n = 1\ 043$): 110 образцов волка евразийского, из которых 10 образцов имели пометку «возможно гибрид»; собака домашняя ($n = 198$); рыжая (дикая; $n = 269$) и черно-бурая (фермерская; $n = 147$) морфы лисицы обыкновенной; собака енотовидная ($n = 165$); гибриды волка с собакой ($n = 4$); песец обыкновенный ($n = 28$); шакал золотистый ($n = 3$); рыжая морфа лисицы из Шотландии ($n = 104$); волк евразийский из Австрии ($n = 8$); гиеновидная собака ($n = 4$), красный волк ($n = 2$) и дикая собака Динго ($n = 1$). Весь биоматериал получен легально; выборки псовых Беларуси являлись репрезентативными.

Материалы и методы исследования. Выделение ДНК осуществлялось по процедуре, предусматривающей инкубацию биоматериала в лизирующем буфере с последующей очисткой ДНК на силикагеле [Boom et al., 1990].

Полиморфизм STR-локусов исследовали в режиме мультилокусной ПЦР на программируемых приборах термоциклического типа C1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации выполнено на генетическом анализаторе 3500 ABI PRISM Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Апробацию метода выявления количества копий гена *Amy2b* проводили с использованием технологии ddPCR и системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) с последующей адаптацией метода под технологию кПЦР, которую проводили на приборах QuantStudio[®] 5 (Thermo Fisher Scientific Inc.) и C1000 с оптическим модулем CFX96[™] (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Расчет численного показателя количества копий гена *Amy2b* по результатам кПЦР осуществляли вручную [Livak, Schmittgen, 2001; Schmittgen, Livak, 2008].

Секвенирование аллелей STR-локусов и генов *Amy2b* и *vMYC* проводили методом Сэнгера [Sanger et al., 1977] в двух направлениях с использованием набора реагентов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) и с электрофоретическим разделением продуктов секвенирования на анализаторе 3500 ABI PRISM.

Валидация разработанных тест-систем осуществлялась по протоколу Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM) и ISO 5725.

Генетико-статистический анализ проводился с использованием программных пакетов GenAlEx v.6.5, STRUCTURE v.2.3.4, Arlequin 3.5.1.3, Cervus v.3.0.7, Minitab[®] 21.4.3 и др.

Исследование генетического полиморфизма подвидов волка евразийского и собаки домашней

На основе скрининга 55 аутосомных STR-локусов отобраны 34 STR-локуса, сконструирована тест-система CanisPlex (CPlex) и проведено генотипирование 198 образцов ДНК собаки домашней, 103 образцов ДНК волка евразийского, 11 образцов гибридных особей волка и собаки.

Апостериорный анализ массивов генотипов волка и собаки в программе STRUCTURE выявил максимальное значение тестовой статистики ΔK при $K = 2$, что свидетельствует о существовании двух генетических кластеров: волка и собаки; последнее успешно согласуется с результатами кластеризации этих подвидов в Италии [Lorenzini et al., 2022] и Российской Федерации [Korablev et al., 2021]. Результаты кластерного анализа согласуются и с данными многомерного анализа по матрице генетических дистанций (PCoA-анализ) (рисунок 1).

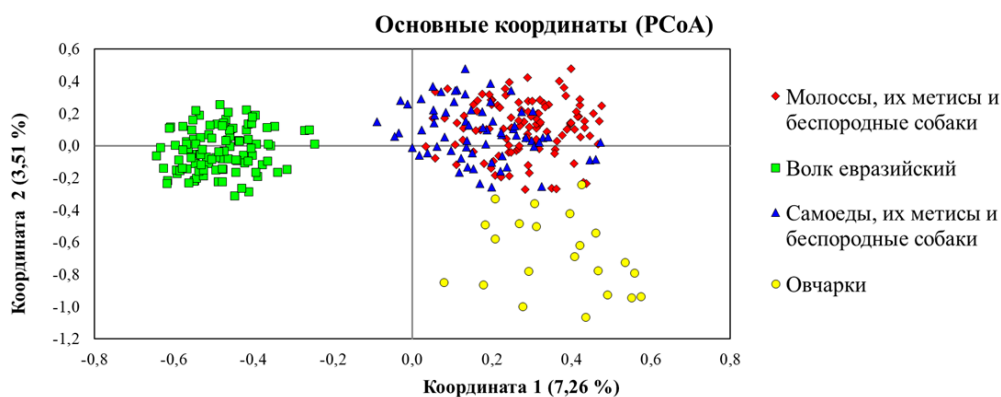


График сгенерирован на основе результатов генотипирования тест-системы CPlex, состоящей из 34 STR: АНТ121, АНTh130, АНТ137, АНTh171, АНТk211, АНТk253, АНTh260, СРН4, СРН12, СХХ279, FH2001, FH2004, FH2010, FH2016, FH2054, FH2079, FH2096, FH2328, FH2361, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, Pez16, Pez17, Ren54P11, Ren64E19, Ren105L03, Ren162C04, Ren169O18, Ren247M23, VGL3438 и vWF.x

Рисунок 1 – Диаграмма результатов PCoA-анализа для выборок волка евразийского и собаки домашней

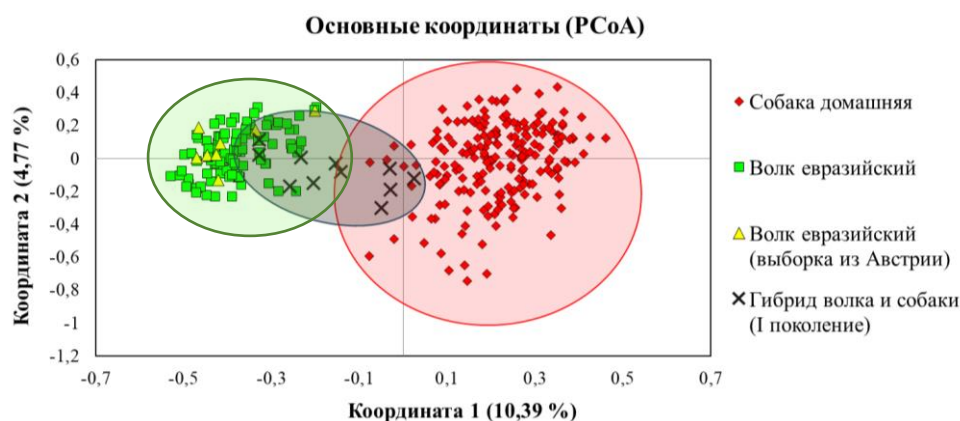
При определении популяционной структуры выборок волков и собак раздельно друг от друга кластер, сформированный образцами волка, оставался гомогенным, а в кластере собак отмечается дистанцирование группы чистопородных овчарок от совокупной выборки.

Наивысшие показатели гетерозиготности были получены для выборки волка: значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности составили 0,730 и 0,786, соответственно, что свидетельствуют о естественном развитии и о наличии мутационно-дрейфового равновесия в природной популяции Беларуси. Более низкие значения гетерозиготности в выборках собак указывают на то, что в генофонде собак имеют место процессы, определяемые инбридингом, как следствие искусственного отбора и генетического дрейфа, которые приводят к снижению разнообразия [Галинская и др., 2019].

Для разработки универсальной криминалистической тест-системы, эффективной при генотипировании образцов волка и собаки, задействованы 15 STR-локусов с преимущественно тетра nukлеотидными tandemными повторами.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) с использованием 15 STR-локусов также выявил значимую [Wright, 1978] дифференциацию между волком и собакой (попарное значение $F_{ST} = 0,0828$; $P < 0,05$). Расчет генетической принадлежности к истинной выборке (Assignment test) показал высокую консолидированность волков и собак: 100 % всех исследованных особей были отнесены к собственным кластерам, что подтверждает успешность дифференциации волка евразийского и собаки домашней.

Волки, обитающие в Австрии, не выявляют различий с выборкой белорусской популяции (рисунок 2). Этот факт указывает на существование единой популяции волка в Центральной Европе, что подтверждается и другими исследователями [Voitani et al., 2022].



Фигурами красного, зеленого и серого цвета обозначены границы разброса генетических дистанций выборок собаки домашней, волка евразийского и гибридных особей волка и собаки соответственно. График сгенерирован на основе результатов генотипирования тест-системы CPlex, состоящей из 15 STR: CPN4, CPN12, FH2001, FH2004, FH2010, FH2016, FH2054, FH2079, FH2096, FH2328, FH2361, Pez16, Pez17, VGL3438 и vWF.x Рисунок 2 – Диаграмма результатов PCoA-анализа для выборок волка евразийского (выборки из Беларуси и Австрии), собаки домашней и гибридных особей

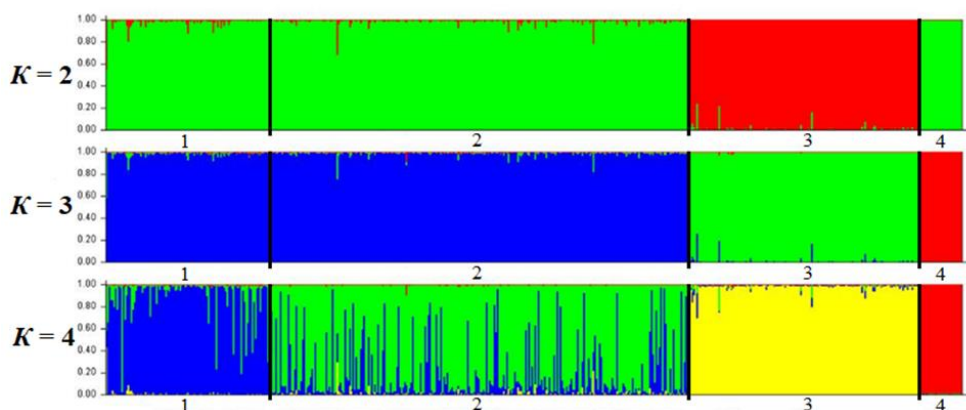
В то же время выборка гибридов волка и собаки при проведении PCoA-анализа заняла «промежуточное» положение между выборками волка и собаки. Невыявление интрогрессии с использованием только одного типа маркеров была также показана итальянскими исследователями по результатам анализа STR [Godinho et al., 2011] и SNP [Lobo et al., 2023] полиморфизмов, что указывает на существование ограничений данного подхода и необходимость выработки альтернативных подходов к идентификации гибридных особей.

Исследование генетического полиморфизма вида лисица обыкновенная

В результате скрининга 51 STR-локуса для исследования генетического полиморфизма лисицы обыкновенной было отобрано 12 STR-локусов,

объединенных в тест-систему VulpesPlex (VPlex) и проведено генотипирование 269 образцов рыжей (дикой), 147 образцов черно-бурой (фермерской) морфы лисицы обыкновенной, 28 образцов песца обыкновенного и 104 образцов лисицы обыкновенной, обитающей в Шотландии.

Результаты кластерного анализа совокупного массива генотипов белорусской и шотландской выборок лисицы, а также песца свидетельствуют о существовании трех генетических кластеров животных: единый кластер для дикой лисицы из Беларуси и Шотландии (синий кластер), фермерской лисицы (зеленый кластер) и песца (красный кластер; рисунок 3).



1 – выборка рыжей (дикой) морфы лисицы обыкновенной из Шотландии; 2 – выборка рыжей (дикой) морфы лисицы обыкновенной из Беларуси; 3 – выборка черно-бурой (фермерской) морфы лисицы обыкновенной; 4 – выборка песца обыкновенного; результаты кластерного анализа сгенерированы на основе результатов генотипирования тест-системы VPlex, состоящей из 12 STR: V602, CPN4, FH2309, FH2001, FH2010, FH2361, FH2328, FH3241, Pez16, Nyct10, Nyct11 и vWF.X

Рисунок 3 – Результаты кластерного анализа выборок песца и лисицы из Шотландии и Беларуси (дикой и фермерской морфы)

При этом выявляется высокая консолидированность и генетическая гомогенность выборок, что указывает на истинную дифференциацию дикой и фермерской лисицы, а также песца и на отсутствие генетической интрогрессии в дикую популяцию лисицы обыкновенной со стороны содержащихся на зверофермах животных этого вида. Достоверность результатов дифференциации диких и фермерских лисиц подтверждается исследованиями ученых Польши [Wierzbicki et al., 2021] и Канады [Lounsberry et al., 2017].

Результаты AMOVA оценивают размах вариаций между выборками дикой и фермерской лисицы в 27,44 %, в то же время процент вариаций между белорусской и шотландской выборками составил 4,64 % (слабое дифференцирование). Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают гипотезу о существовании единой популяции лисицы в Европе и делают возможным применение тест-системы VPlex в исследованиях генетического разнообразия лисицы в других странах.

Исследование генетического полиморфизма вида собака енотовидная

В результате изучения полиморфизма 54 STR-локусов отобрано 15 STR, сконструирована тест-система NuctereutesPlex (NPlex) и проведено генотипирование 165 биологических образцов собаки енотовидной.

Апостериорный анализ массивов генотипов выявил платообразное распределение значений тестовой статистики ΔK , которое, наравне с результатами PCoA-анализа (рисунок 4) и низким значением субпопуляционного индекса фиксации аллелей ($F_{ST} = 0,0148$), указывает на отсутствие кластеризации [Pritchard et al., 2010], что в комплексе с полученными оптимальными показателями генетического разнообразия может свидетельствовать о наличии единой панмиктической популяции енотовидной собаки в стране.

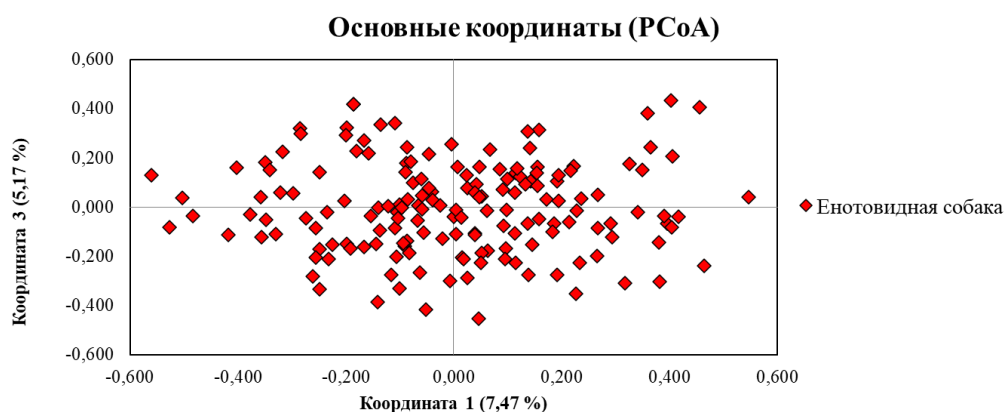


График сгенерирован на основе результатов генотипирования тест-системы NPlex, состоящей из 15 STR: FH2096, FH2274, FH2361, NPPM30, NPPM609, NPPM965, Nuct3, Nuct4, Nuct6, Nuct9, Nuct10, Nuct11, Pez17, V602 и vWF.X

Рисунок 4 – Диаграмма результатов PCoA-анализа для выборки собаки енотовидной

Показатели ожидаемой (0,665) и наблюдаемой (0,670) гетерозиготности согласуются со значениями генетического разнообразия, установленными для популяции енотовидной собаки в Литве [Griciuvienė et al., 2016], что в совокупности с показанным отсутствием кластеризации подтверждает предположение о существовании единой популяции енотовидной собаки в Беларуси и близлежащих странах. При этом известно, что выборки Финляндии и Дании представляют собой отдельные популяции енотовидной собаки [Nørgaard et al., 2017; Drygala et al., 2016]. Поскольку в естественном ареале обитания вида выявлены 4 субпопуляции [Hong et al., 2013], настоящее исследование в совокупности с приведенными выше фактами указывает на разные источники интродукции енотовидной собаки в Европе.

Исследование межвидового генетического полиморфизма представителей семейства Псовые

На основе изучения полиморфизма 70 STR-локусов и четырех локусов половой принадлежности отобрано 6 аутосомных STR-локусов с сильно

выраженным дифференцирующим потенциалом на видовом уровне: CPN4, CPN12, FH2010, Nyct10, VGL3438, vWF.x., на основе которых вместе с локусами половой принадлежности DBX6 и DBY7 была сформирована тест-система CanidaeDifferensPlex (CDPlex) и проведено генотипирование 1 043 биологических образцов диких и домашних животных семейства Псовые.

Показано, что аллельный полиморфизм 6 аутосомных локусов формирует различающиеся совокупности генетических признаков для всех 4 основных видов псовых, позволяющие безошибочно дифференцировать виды. При этом установлено, что физическая природа дифференциации, включая локусы DBX6 и DBY7, заключается в наличии инсерций и делеций в нуклеотидной последовательности аллелей у отдельных видов псовых, а также в утрате полиморфизма при переносе STR-локуса на другой вид (таблица 1).

Таблица 1 – Диагностические признаки тест-системы CDPlex

Локусы	Вид (подвид) животного			
	Лисица обыкновенная	Песец обыкновенный	Собака енотовидная	Волк евразийский / собака домашняя
vWF.X	121 / 121	121 / 121	121 / 121	133–187
CPN12	181 / 181	184 / 184	182 / 182	186–208
Nyct10	181 / 181	n/a	187–190	n/a
VGL3438	84 / 84	80 / 80	137–165	101–137
FH2010	215–239	n/a	215–239	215–239
CPN4	122 / 122	122 / 122	*	136–152
DBX6	242	242	246	246
DBY7	117	115	117	117

Примечания

1 В таблице указана абсолютная длина амплифицируемых фрагментов в п.н. согласно результатам секвенирования.

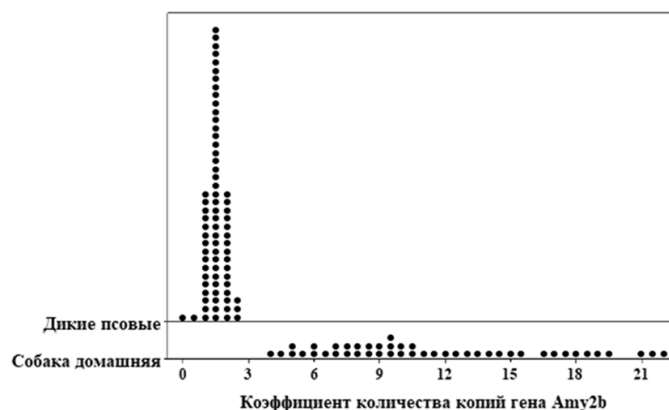
2 n/a – отсутствие амплификации.

3 Цветом выделены признаки, свойственные только данному виду, отличающие его от других видов семейства псовых.

4 * – для локуса характерна невоспроизводимость генетических профилей при отличном от других псовых диапазоне молекулярных размеров аллелей (диапазон молекулярных размеров 125–132).

Исследование варибельности копий гена альфа-амилазы у диких и домашнего представителей семейства Псовые

Исследование варибельности копий гена *Amy2b* осуществлялось на полной выборке из 1 043 биологических образцов путем амплификации ДНК-мишеней *Amy2b* и *vMUC* с последующим расчетом количества копий гена *Amy2b*. Ген *vMUC* в качестве референсного гена был задействован впервые в нашем исследовании. Показано, что методом ddPCR успешно устанавливается дифференциация всех диких (2 копии гена *Amy2b*) и домашних (больше 2 копий) псовых (рисунок 5).



Выше черной горизонтальной линии приведены значения коэффициентов количества копий гена *Amy2b*, обнаруженные у диких представителей псовых, ниже – у собаки домашней; на оси абсцисс обозначено значение коэффициента выявленного количества копий гена *Amy2b*; каждый символ представляет собой 9 выявленных одинаковых значений коэффициента количества копий гена *Amy2b*

Рисунок 5 – Точечная диаграмма, отражающая значение коэффициента количества копий гена *Amy2b* у исследованных псовых

Метод адаптирован под технологию кПЦР. Если значение коэффициента количества копий гена *Amy2b* по результатам кПЦР находится в диапазоне 0,18–2,81, это свидетельствует о происхождении исследуемого образца от дикого животного (волк евразийский, обе морфы лисицы обыкновенной, песец и собака енотовидная и др.). Если значение коэффициента находится в диапазоне 3,21–23,59, это свидетельствует о происхождении исследуемого биологического образца от собаки домашней.

Генетическая идентификация гибридных особей волка и собаки

Использование Байесовского подхода по результатам генотипирования STR-локусов позволяет достоверно установить принадлежность образца волку или собаке, однако неприменимо в идентификации гибридов (рисунок 2). По результатам Assignment test все гибридные особи однозначно относятся к выборке волка евразийского. В то же время, исследование вариабельности копий гена *Amy2b* у этих же гибридных особей дает значение коэффициента количества копий гена, характерное для домашнего подвида псовых (диапазон значений 3,29–22,78). Таким образом, использование только частотных характеристик аллелей STR-локусов не всегда достаточно для определения гибридных особей волка и собаки.

Четыре биологических образца являлись искусственно выведенными гибридами волка и собаки первого поколения, – для них был получен «домашний» тип коэффициента количества копий гена *Amy2b*. Из 10 биологических образцов с пометкой «возможно гибрид» для 7 образцов был установлен «домашний» тип коэффициента количества копий гена *Amy2b*. При этом все гибридные особи

(искусственные и свободноживущие) относились к «дикому» типу по результатам STR-генотипирования. Из этого следует, что использование комбинированного подхода – STR-анализа и анализа количества копий гена *Amy2b*, – позволяет достоверно установить гибридные особи волка и собаки.

В конечном итоге в совокупной выборке волка евразийского ($n = 110$), было выявлено 7 свободноживущих гибридов волка и собаки. Территориальное расположение гибридных особей (3 образца из Верхнедвинского района, два образца из смежных Слонимского и Волковысского районов и по одному из Ивьевского и Клецкого районов) позволяет предположить, что интрогрессивная гибридизация по гену *Amy2b* со стороны собак в генофонд волка евразийского (6,36 %) скорее отражает региональные особенности существования популяций волка локального характера, нежели имеет в основе критическую антропогенную деформацию экосистем в масштабе страны.

Разработка криминалистических тест-систем для ДНК-дифференциации и ДНК-идентификации представителей семейства Псовые

На основе исследования полиморфизма 70 STR-локусов у видов семейства Псовые сформированы оптимальные панели STR-локусов и сконструированы тест-системы: CPlex (идентификация волка и собаки), VPlex (идентификация лисицы), NPlex (идентификация собаки енотовидной), CDPlex (дифференциация псовых Беларуси) и Canis-RT (дифференциация диких и домашнего представителей семейства Псовые).

Все локусы, включенные в тест-системы, наследуются независимо и соответствуют равновесию Харди–Вайнберга ($P > 0,05$). Средние значения информационного содержания полиморфизма для локусов разработанных тест-систем составили от 0,632 (для NPlex) до 0,742 (для CPlex), что указывает на их высокую информативность, а сила исключения, обеспечиваемая каждой тест-системой, позволяет достигать надежного уровня доказательств в криминалистическом ДНК-анализе.

Впервые в судебной экспертизе объектов животного происхождения рассчитаны значения коэффициента θ -value. Показано, что значения частот встречаемости генотипов без учета и с учетом θ -value различаются на два (VPlex) или три (CPlex) порядка. Применение θ -value позволит оперировать наиболее достоверными результатами экспертного идентификационного исследования.

Тест-системы валидированы в соответствии с протоколом SWGDAM и по стандарту ISO 5725, а также адаптированы для использования реагентов и приборного оборудования различных производителей, для чего на основе секвенирования введено тандемное исчисление аллелей всех тест-систем. Все тест-системы апробированы на коллекционных образцах и на реальных криминалистических объектах и успешно применяются в судебной экспертизе объектов животного происхождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Впервые в Беларуси проведено масштабное комплексное исследование представителей семейства Псовые: волка евразийского и собаки домашней, лисицы обыкновенной и собаки енотовидной с использованием 70 STR-локусов. Разработаны оптимальные панели STR-локусов, пригодные для изучения популяционно-генетической структуры каждого исследуемого вида. Анализ генетического разнообразия и генетической структуры природных популяций диких видов псовых, обитающих в Беларуси, выявил высокий уровень их гомогенности, наличие панмиксии и мутационно-дрейфового равновесия [1–А; 2–А; 4–А; 6–А; 7–А; 8–А; 9–А; 14–А].

2. Результаты статистического анализа массивов генотипов свидетельствуют о существовании отдельных генетических пулов волков и собак; в комплексе с оценкой количества копий гена *Amy2b* выявлена интрогрессия (6,36 %) со стороны собак в генофонд волка евразийского как следствие региональных особенностей существования популяций волка локального характера. Созданы научные основы для дифференциации подвидов и достоверной идентификации гибридных особей волка и собаки [3–А; 4–А; 13–А].

3. Выявлены достоверные различия генетических характеристик диких (рыжая морфа) и фермерских (черно-бурая морфа) лисиц обыкновенных. Результаты анализа молекулярной дисперсии свидетельствуют об отсутствии генетической интрогрессии между фермерскими и дикими лисицами и угрозы генетической целостности для дикого вида. Получены доказательства существования единой европейской популяции лисицы обыкновенной [2–А; 10–А; 11–А; 15–А; 17–А].

4. Разработаны оригинальные способ и тест-система для установления видового происхождения биологических образцов волка (включая подвид собака домашняя), лисицы обыкновенной, собаки енотовидной и песца обыкновенного, а также метод ДНК-дифференциации биологических образцов волка евразийского и собаки домашней. Оригинальность разработок подтверждена двумя патентами на изобретение. Разработанные технологии валидированы на реальных криминалистических объектах, что позволяет их использовать при проведении судебной экспертизы объектов животного происхождения [5–А; 12–А; 14–А; 18–А; 19–А; 20–А].

5. На основе молекулярно-генетического полиморфизма видов семейства псовые созданы средства криминалистического генотипирования, включающие тест-систему для установления видового происхождения образца в группе волк/собака, лисица, енотовидная собака; тест-систему для дифференциации образцов подвидов волк и собака; тест-системы для

внутривидовой идентификации особей (образцов) волка/собаки, лисицы и енотовидной собаки, которые внедрены в работу судебно-экспертных лабораторий. Разработаны информационно-статистические комплексы для анализа генетических данных псовых, использование которых минимизирует риски экспертных ошибок субъективного характера. Впервые на территории стран СНГ проведено системное исследование генетического полиморфизма видов семейства Псовые и разработка методического инструментария для криминалистических исследований образцов с мест правонарушений в отношении объектов животного мира [1–А; 2–А; 3–А; 4–А; 5–А; 16–А; 21–А; 22–А; 23–А; 24–А; 25–А; 26–А; 27–А; 28–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Изданы методики видовой ДНК-дифференциации представителей семейства Псовые [21–А], ДНК-дифференциации волка и собаки [25–А], а также методики внутривидовой ДНК-идентификации биологических образцов волка и собаки, собаки енотовидной и лисицы [22–А, 23–А, 24–А]. Разработаны методики и автоматизированные средства расчета уровня достоверности экспертного вывода при установлении принадлежности образца к волку, собаке или их гибридам, в идентификационном исследовании и установлении биологического родства животных [26–А, 27–А, 28–А]. Все методики включены в Реестр методических материалов в сфере судебно-экспертной деятельности Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработок в национальную правовую систему.

2. Получены 2 патента на изобретение: «Способ и тест-система для видовой ДНК-идентификации биологических образцов представителей семейства псовых методом ПЦР» под № 24445 и «Способ дифференциации биологического материала животного, относящегося к семейству псовых, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» под № 24287, предназначенные для проведения судебных экспертиз объектов животного происхождения [19–А; 20–А].

3. Полученные научные сведения рекомендуется применять в системе ведения охотничьего хозяйства, при мониторинге состояния и численности диких стай, выявлении уровня гибридизации, а также при мониторинге соблюдения правил содержания домашних животных и генетических технологий разведения животных на зверофермах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Публикации, соответствующие пункту 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь

1–А. A robust test system for DNA identification of Raccoon dogs / **А. Е. Hrebianchuk**, O. N. Lukashkova, S. A. Kotava, I. S. Tsybovsky // Russian Journal of Genetics. – 2023. – Vol. 59, № 5. – P. 503–517.

2–А. Характеристика генетической структуры дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) в Беларуси / **А. Е. Гребенчук**, А. С. Парфенова, О. Н. Лукашкова, И. С. Цыбовский // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2023. – № 3. – С. 34–46.

3–А. **Hrebianchuk, A. E.** A universal panel of STR loci for the study of polymorphism of the species *Canis lupus* and forensic identification of dog and wolf / **А. Е. Hrebianchuk**, I. S. Tsybovsky // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. – 2024. – Vol. 28, № 1. – P. 98–107.

4–А. A panel of tetranucleotide STR markers as an alternative approach to forensic DNA identification of wolf and dog / **А. Е. Hrebianchuk**, N. S. Parfionava, T. V. Zabauskaya, I. S. Tsybovsky // Animal Genetics. – 2024. – Vol. 55, № 3. – P. 440–451.

5–А. **Hrebianchuk, A. E.** Forensic identification of species and subspecies of *Canidae* family by cross-species PCR and real-time PCR / **А. Е. Hrebianchuk**, N. S. Parfionava, I. S. Tsybovsky // Animal Genetics. – 2025. – Vol. 56, № 3. – P. e70019.

Статьи в других изданиях

6–А. **Гребенчук, А. Е.** Псовые как объект экспертного ДНК-анализа: криминалистические и генетические аспекты / А. Е. Гребенчук // Вопросы криминологии криминалистики и судебной экспертизы : сб. науч. трудов. / НПЦ Гос. ком. судеб. экспертиз Респ. Беларусь. – Минск, 2016. – Т. 2, № 40. – С. 135–140.

Материалы конференций

7–А. Forensic DNA analysis of the biological objects sampled from the poaching sites in Belarus / A. Tsiatsiuyeu, S. Kotova, I. Tsybovsky, **А. Hrebianchuk** // 1st FORENSICS 2017 : proceedings of the 1st International Caparica conference in translational forensics, Caparica, 20–23 Nov. 2017 / Proteomass ; ed.: M. Silva [et al.]. – Caparica, 2017. – P. 141.

8–А. **Гребенчук, А. Е.** Разработка методик ДНК-идентификации в семействе Псовые для экспертного сопровождения дел о незаконной охоте и жестоком обращении с животными / **А. Е. Гребенчук**, И. С. Цыбовский, С. А. Котова // Актуальні питання судової експертології, криміналістики та

кримінального процесу : матеріали міжннар. наук.-практ. конф., Київ, 5 лист. 2019 р. / КНДІСЕ Мінюста України; ред.: О. Г. Рувін [та інш.]. – Київ, 2019. – С. 140–143.

9–А. **Гребенчук, А. Е.** Создание тест-системы ДНК-идентификации особей вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) для решения судебно-экспертных задач / **А. Е. Гребенчук, О. Н. Лукашкова** // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы IV Международной научной конференции к 55-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, 3–4 нояб. 2020 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2020. – С. 89.

10–А. Методическое обеспечение ДНК-идентификации пушных промысловых и охраняемых видов животных для целей экспертной практики в Республике Беларусь / С. А. Котова, **А. Е. Гребенчук, О. Н. Лукашкова, А. Н. Верчук** // Актуальні питання судової експертизи і криміналістики : матеріали міжннар. наук.-практ. конф.-полілогу, Харків, 15–16 квіт. 2021 р. / Національний науковий центр «Інститут судових експертиз ім. Засл. проф. М. С. Бокаріуса»; редкол.: О. М. Ключев (гол. ред.) [та інш.]. – Харків, 2021. – С. 192–193.

11–А. Анализ ДНК нечеловеческого происхождения – новое экспертное направление в Республике Беларусь / **А. Е. Гребенчук, Т. В. Забавская, Т. В. Осадчук, Д. Э. Недзвецкая, А. О. Рябцева, А. Н. Верчук, О. Н. Лукашкова, В. И. Рыбакова, А. С. Парфенова, С. А. Полевой, С. А. Котова, И. С. Цыбовский** // Теория и практика фундаментальных и прикладных исследований в сфере судебно-экспертной деятельности и ДНК-регистрации населения Российской Федерации : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Уфа, 23–24 сент. 2021 г. / Институт права БашГУ ; редкол.: Ф. Г. Аминев (гл. ред.) [и др.]. – Уфа, 2021. – С. 42–46.

12–А. **Гребенчук, А. Е.** Новый подход к молекулярной дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней в судебной биологической экспертизе объектов животного происхождения / **А. Е. Гребенчук, А. С. Парфенова, И. С. Цыбовский** // Генетические процессы в популяциях : материалы научной конференции с международным участием, посвященной 50-летию юбилею лаборатории популяционной генетики им. Ю.П. Алтухова ИОГен РАН и 85-летию со дня рождения академика Юрия Петровича Алтухова, Москва, 11–14 окт. 2022 г. / ИОГен РАН ; редкол.: Д. В. Политов [и др.]. – Москва, 2022. – С. 21.

13–А. Панель из 14 STR локусов для экспертной ДНК-идентификации волка обыкновенного (*Canis lupus lupus*) и собаки домашней (*Canis lupus familiaris*) / **А. Е. Гребенчук, А. С. Парфенова, Т. В. Забавская, И. С. Цыбовский** // Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы : материалы V Международной научной конференции,

посвященной 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова, Минск, 21–25 нояб. 2022 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси ; редкол.: А. В. Кильчевский [и др.]. – Минск, 2022. – С. 94.

14–А. **Гребенчук, А. Е.** Комплексный подход к экспертному анализу биологических объектов на примере семейства Псовые / **А. Е. Гребенчук** // Судебная экспертиза: теория и практика в современных условиях : материалы III Международной научно-практической конференции, Минск, 26-27 апр. 2023 г. / Гос. ком. судеб. экспертиз Респ. Беларусь ; редкол.: А. А. Волков (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2023. – С. 163–165.

15–А. Тест-система для криминалистической ДНК-идентификации лисицы обыкновенной на основе 14 микросателлитных локусов / **А. Е. Гребенчук**, А. С. Парфенова, О. Н. Лукашкова, И. С. Цыбовский // Методы судебной генетики 2023 : материалы конференции, Москва, 14–15 сент. 2023 г. / НПК «Гордиз», Инновационный Фонд Сколково. – Москва, 2023. – С. 50.

Тезисы докладов конференций

16–А. Development of techniques of forensic identification of wild and domestic animals on the basis of a study of genetic polymorphism of STR-loci / **A. Hrebianchuk**, I. Tsybovsky, S. Kotova, D. Nedzvedskaya, O. Lukashkova, E. Spivak, V. Rybakova, T. Zabavskaya, A. Rabtsava // 4th annual meeting in conservation genetics : abstract book, Frankfurt am Main, 26–28 Feb. 2020. / Senckenberg Research Institute, Natural History Museum Frankfurt am Main. – Frankfurt am Main, 2020. – P. 92.

17–А. Development of 14-short tandem repeat (STR) panel for forensic DNA analysis of red fox / **A. Е. Hrebianchuk**, N. S. Parfionava, V. N. Lukashkova, S. A. Kotova, I. S. Tsybovsky // ISAG 2021 Virtual conference : abstract book of the International society for animal genetics virtual conference, 26–30 July 2021. – 2021. – P. 29.

18–А. **Hrebianchuk, A. E.** ISAG Bursary Award: A new approach to the molecular differentiation of the wolf and the domestic dog in wildlife forensics / **A. E. Hrebianchuk**, I. S. Tsybovsky // ISAG 2023 : abstract book of the 39th International society for animal genetics conference, Cape Town, 2–7 July 2023. – Cape Town, 2023 – P. 44.

Патенты на изобретение

19–А. Патент ВУ 24287, МПК C12Q 1/6809 (2018.01), C12Q 1/6886 (2018.01), C12Q 1/6888 (2018.01). Способ дифференциации биологического материала животного, относящегося к семейству псовых, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени : № а 20220180 : заявлено 20.07.2022 : опубл. 28.02.2024 / **Гребенчук А. Е.**, Парфенова А. С., Полевой С. А.,

Цыбовский И. С. ; заявитель ГУ «НПЦ Гос. ком. судебных экспертиз Респ. Беларусь». – 12 с.

20–А. Патент ВУ 24445, МПК С12Q 1/6888 (2018.01). Способ и тест-система для видовой ДНК-идентификации биологических образцов представителей семейства псовых методом ПЦР : № а 20220291 : заявлено 23.11.2022 : опубл. 05.07.2024 / **Гребенчук А. Е.**, Парфенова А. С., Забавская Т. В., Лукашкова О. Н., Цыбовский И. С. ; заявитель ГУ «НПЦ Гос. ком. судебных экспертиз Респ. Беларусь». – 61 с.

Методики

21–А. Методика видовой ДНК-идентификации отдельных представителей семейства Псовые, обитающих на территории Республики Беларусь / **А. Е. Гребенчук**, А. С. Парфенова, Т. В. Забавская, О. Н. Лукашкова, С. А. Котова, И. С. Цыбовский. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2021. – 36 с.

22–А. Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных подвидов волк обыкновенный (*Canis lupus lupus*) и собака домашняя (*Canis lupus familiares*) / **А. Е. Гребенчук**, Т. В. Забавская, А. С. Парфенова, С. А. Котова ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2022. – 53 с.

23–А. **Гребенчук, А. Е.** Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) / **А. Е. Гребенчук**, О. Н. Лукашкова, С. А. Котова ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2022. – 45 с.

24–А. Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) / **А. Е. Гребенчук**, О. Н. Лукашкова, А. С. Парфенова, С. А. Котова ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2022. – 50 с.

25–А. **Гребенчук, А. Е.** Методика ДНК-дифференциации животных подвидов волк обыкновенный (*Canis lupus lupus*) и собака домашняя (*Canis lupus familiaris*) методом ПЦР в режиме реального времени / **А. Е. Гребенчук**, А. С. Парфенова, С. А. Полевой ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2022. – 26 с.

26–А. **Гребенчук, А. Е.** Методика применения информационно-статистического комплекса для анализа генетических данных животных биологического вида *Canis lupus* – волка обыкновенного (*Canis lupus lupus*) и собаки домашней (*Canis lupus familiaris*) / **А. Е. Гребенчук** ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2024. – 56 с.

27–А. **Гребенчук, А. Е.** Методика применения информационно-статистического комплекса для анализа генетических данных животных

биологического вида енотовидная собака (*Nyctereutes procyonoides*) / **А. Е. Гребенчук** ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2024. – 39 с.

28–А. **Гребенчук, А. Е.** Методика применения информационно-статистического комплекса для анализа генетических данных животных биологического вида лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) / **А. Е. Гребенчук** ; под ред. И. С. Цыбовского. – Минск : РУП «БелНИИТ Транстехника», 2024. – 46 с.

РЭЗІЮМЕ

Грэбянчук Аляксандра Яўгеньеўна

Аналіз малекулярна-генетычнага палімарфізму ў сямействе Сабачыя (*Canidae*) для вырашэння судова-экспертных задач

Ключавыя словы: генетычны палімарфізм, STR-локусы, папуляцыйная генетыка, зменлівасць копій гена *Amy2b*, дыферэнцыяцыя, ідэнтыфікацыя, сабачыя, судовая экспертыза.

Мэта даследвання: ацаніць генетычны палімарфізм і структуру папуляцый прадстаўнікаў сямейства Сабачыя, на аснове атрыманых вынікаў распрацаваць тэхналогіі міжвідавой ДНК-дыферэнцыяцыі відаў (падвідаў) і ўнутрывідавой ідэнтыфікацыі асобных асобін ваўка еўразійскага, сабакі свойскага, сабакі янотападобнага і ліса звычайнага і стварыць метадычнае і інфармацыйна-даведачнае забеспячэнне для выкарыстання ў судовай экспертызе аб'ектаў жывёльнага паходжання.

Методыка даследвання: выдзяленне ДНК, генатыпаванне STR-локусаў, колькасная ПЛР, секвеніраванне ДНК, генетыка-статыстычны аналіз.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Праведзены аналіз генетычнай разнастайнасці і структуры папуляцый сабачых з выкарыстаннем 70 STR-локусаў; выяўлены высокі ўзровень гамагеннасці дзікіх папуляцый, наяўнасць панміксіі і мутацыйна-дрэйфавай раўнавагі; у комплексе з аналізам зменлівасці копій гена *Amy2b* зафіксаваны факт гібрыдызацыі ваўка і сабакі ў дзікай прыродзе. Распрацаваны, валідаваны і ўкаранёны ў экспертную практыку тэхналогіі ДНК-генатыпавання сабачых (у тым ліку выяўленне гібрыдных асобін ваўка і сабакі) і аўтаматызаваны аналіз генетычных даных. Упершыню на тэрыторыі СНД праведзена сістэмнае даследаванне генетычнага палімарфізму сабачых і распрацоўка метадычнага інструментарыя для яго ўжывання ў крыміналістыцы.

Рэкамендацыі па выкарыстанню. Атрыманыя навуковыя звесткі можна ўжываць у крыміналістыцы, сістэме вядзення паляўнічай гаспадаркі, пры маніторынгу стану і колькасці дзікіх зграй, у кантролі за выкананнем правіл утрымання хатніх жывёл і генетычных тэхналогій гадоўлі.

Галіна ўжывання: судовая экспертыза, тэрыялогія, генетыка, лясная гаспадарка, гадоўля жывёл.

РЕЗЮМЕ

Гребенчук Александра Евгеньевна

Анализ молекулярно-генетического полиморфизма в семействе Псовые (*Canidae*) для решения судебно-экспертных задач

Ключевые слова: генетический полиморфизм, STR-локусы, популяционная генетика, вариабельность копий гена *Amy2b*, дифференциация, идентификация, псовые, судебная экспертиза.

Цель исследования: оценить генетический полиморфизм и структуру популяций представителей семейства Псовые, на основе полученных результатов разработать технологии межвидовой ДНК-дифференциации видов (подвидов) и внутривидовой идентификации отдельных особей волка евразийского, собаки домашней, собаки енотовидной и лисицы обыкновенной и создать методическое и информационно-справочное обеспечение для использования в судебной экспертизе объектов животного происхождения.

Методы исследования: выделение ДНК, генотипирование STR-локусов, количественная ПЦР, секвенирование ДНК, генетико-статистический анализ.

Полученные результаты и их новизна. Проведен анализ генетического разнообразия и структуры белорусских популяций псовых с использованием 70 STR-локусов; выявлен высокий уровень гомогенности диких популяций, наличие панмиксии и мутационно-дрейфового равновесия; в комплексе с анализом вариабельности копий гена *Amy2b* зафиксирован факт гибридизации волка и собаки в дикой природе. Разработаны, валидированы и внедрены в экспертную практику технологии ДНК-генотипирования псовых (включая выявление гибридных особей волка и собаки) и автоматизированный анализ генетических данных. Впервые на территории СНГ проведено системное исследование генетического полиморфизма псовых и разработка методического инструментария для его применения в криминалистике.

Рекомендации по использованию. Полученные научные сведения применимы в криминалистике, системе ведения охотничьего хозяйства, при мониторинге состояния и численности диких стай, в контроле за соблюдением правил содержания домашних животных и генетических технологий разведения.

Область применения: судебная экспертиза, териология, генетика, лесное хозяйство; разведение животных.

SUMMARY

Hrebianchuk Aliaksandra

Analysis of molecular genetic polymorphism in the *Canidae* family for solving forensic problems

Key words: genetic polymorphism, STR loci, population genetics, copy number variation of the *Amy2b* gene, differentiation, identification, canids, forensic science.

The aim of the study is to assess the genetic polymorphism and population structure of the representatives of the *Canidae* family. Based on the obtained results, the study seeks to develop technologies for interspecific DNA differentiation of species (subspecies) and intraspecific identification of the Eurasian wolf, domestic dog, raccoon dog, and red fox, as well as to create the methodological and reference toolkits for forensic use.

Research methods: DNA extraction, STR genotyping, quantitative PCR, DNA sequencing, statistical analysis of genetic data.

The results obtained and their novelty. Using 70 STR loci, an analysis of the genetic diversity and structure of Belarusian canine populations was carried out; a high level of homogeneity of wild populations, the presence of panmixia and mutation-drift equilibrium were revealed; in combination with the analysis of the copy number variation of the *Amy2b* gene, the fact of hybridization of wolves and dogs in the wild was recorded. Technologies for DNA genotyping of canines (including the identification of hybrid individuals of wolves and dogs) and automated analysis of genetic data have been developed, validated and implemented into forensic practice. For the first time in the CIS, a systematic study of genetic polymorphism in canines was conducted and methodological tools were developed for its application in forensic science.

Recommendations for application. The obtained scientific results are applicable in forensics, hunting management, monitoring the condition and numbers of wild packs, monitoring compliance with the rules for keeping domestic animals and genetic breeding technologies.

Application scope: forensic science, theriology, genetics, forestry, animal breeding.

