

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Гребенчук Александры Евгеньевны
«Анализ молекулярно-генетического полиморфизма в семействе Псовые (*Canidae*) для решения судебно-экспертных задач»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

1. Соответствие диссертации специальности и отрасли наук, по которым она представлена к защите.

Диссертационная работа Гребенчук А.Е. соответствует специальности 03.01.07 – молекулярная генетика биологической отрасли наук, так как включает исследование аллельного полиморфизма аутосомных STR-локусов, вариабельность количества копий гена альфа-амилазы при ДНК-генотипировании представителей семейства Псовые, а также анализ генетической структуры и генетического разнообразия белорусских популяций вышеназванного семейства.

Тематика работы соответствует пунктам 3. «Биологические системы и технологии»; 10. «Экология и природопользование», 13. «Безопасность человека, общества и государства» приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг., утвержденных постановлением Совета Министров Республики Беларусь № 190 от 12.03.2015 г. Работа также соответствует п. 2. «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», п. 3. «Энергетика, строительство, экология и рациональное природопользование» и п. 6. «Обеспечение безопасности человека, общества и государства» Перечня приоритетных направлений научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., утвержденного Указом Президента Республики Беларусь №156 от 7 мая 2020 г. № 156.

Представленная диссертация в полной мере соответствует паспорту специальности 03.01.07-молекулярная генетика, утвержденному Приказом ВАК РБ №300 от 23.11.2016, а конкретно областям исследований, указанных в пп. 7, 8, 9, 12, 19.

2. Актуальность темы диссертации.

Семейство Псовые (*Canidae*) – наиболее массово распространенные хищники в природных экосистемах Беларуси, зачастую имеют определяющую роль в трофоценологических цепях и непосредственно влияют на сложившиеся природные взаимодействия. Среди всех псовых наибольшей численностью характеризуется одомашненный подвид волка – собака домашняя. На сегодняшний момент, ввиду выраженного влияния псовых на динамику

популяций других видов диких животных, численность диких псовых является предметом строгого контроля, ввиду чего практически все они являются ненормируемыми видами в плане добычи.

Процесс гибридизации представителей семейства Псовые длительное время является предметом пристального исследования зоологов и генетиков всего мира. Причиной тому является близкое генетическое родство волка и домашней собаки, а также наличие идентичного числа хромосом у видов рода *Canis* является благоприятным предиктором для свободного скрещивания в пределах рода с образованием плодовитого потомства. Проблема гибридизации близкородственных видов диких животных является одной из краеугольных в вопросах сохранения биоразнообразия. При этом, сам процесс гибридизации несет в себе серьезные экологические, этологические и физиологические последствия для потомков близкородственных видов, внося также изменения в генофонд популяции и имея долгосрочные негативные влияния на ее жизнеспособность.

Точная своевременная видовая идентификация представителей семейства Псовых, а также выявление гибридов, исследование их роли в трофоценологических, а также внутри- и межпопуляционных взаимодействиях имеет ведущую роль в разработке стратегий контроля их распространения и сохранения видов дикой природы.

Криминалистический ДНК-анализ объектов животного происхождения является современным высокотехнологичным направлением судебной экспертизы, использующим молекулярно-генетические методы для таксономической идентификации по биологическим остаткам. Сегодня этот метод играет определяющую роль в расследовании преступлений, связанных с объектами животного мира, а также случаев фальсификации продукции животного происхождения. Ввиду важности данного метода, отдельным вопросом стоит разработка высокоточных тест-систем для идентификации видов семейства Псовые для использования в судебно-экспертных задачах: в случае необходимости подтверждения нападения дикого животного на человека или домашнее животное, либо легализации элиминирующих мероприятий по отношению к дикому животному, важно с высокой долей вероятности идентифицировать его вид, подтвердить либо опровергнуть его гибридное происхождение.

Разработке стандартизированных тест-систем для видовой идентификации, а также определения волчье-собачьих гибридов посвящен ряд исследований, в ходе которых установлены полиморфные локусы для отдельных видов волка. Также разработаны коммерческие тест-системы для генотипирования собак (QIAGEN GmbH, ThermoFisher Scientific и др.), однако данные тест-системы, как правило, используются только для домашней собаки и не имеют должной разрешающей способности на диких представителях семей-

ства Псовые. Таким образом, в мире имеется определенный диагностический дефицит, выражающийся в наличии необходимости создания панелей ядерных маркеров (таких как STR-микросателлиты и однонуклеотидный полиморфизм SNP) для точной видовой, подвидовой идентификации особей, а также идентификации гибридов первого (F1) поколения.

Учитывая вышесказанное, актуальность и значимость диссертационной работы Гребенчук А.Е. не вызывают сомнений.

3. Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту.

Автором работы впервые на территории стран СНГ проведено системное исследование генетического полиморфизма видов семейства Псовые, разработан и внедрен в практику методический инструментарий для криминалистических исследований образцов с мест правонарушений и в отношении объектов животного мира.

Впервые для СНГ разработан комплекс из 8 методик для криминалистического ДНК-генотипирования представителей семейства Псовые с автоматизированным расчетом результатов, реализуемых на базе 5 специализированных тест-систем, что делает возможным достоверное установление подвидовой, видовой, половой принадлежности и индивидуального тождества животных с минимальными рисками экспертных ошибок.

Впервые для Беларуси разработаны оптимальные панели STR-локусов, пригодные для изучения популяционно-генетической структуры представителей семейства Псовые. Впервые для Беларуси с использованием 70 STR-локусов проведено масштабное комплексное исследование представителей семейства Псовые, а именно волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной и собаки енотовидной, что позволило выявить высокий уровень гомогенности в природных популяциях диких видов псовых, а также наличие панмиксии и мутационно-дрейфового равновесия.

4. Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность и достоверность полученных результатов обусловлены применением в исследовании современных молекулярно-генетических методов лабораторных исследований, анализе большого фактического материала. Защищаемые положения опубликованы в ведущих рецензируемых изданиях, подтверждены экспериментальным материалом и соответствуют поставленным целям и задачам исследований.

Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на многочисленных международных конференциях и научных семинарах.

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

5. Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации.

Результаты и основные научные положения диссертационной работы характеризуются выраженной научной значимостью.

Диссертанткой применены современные молекулярно-генетические методы исследований, которые позволили, с использованием 70 STR-локусов, провести анализ генетического разнообразия и структуры представителей семейства Псовые, обитающих в Беларуси.

Установлен высокий уровень гомогенности диких популяций семейства Псовые, обитающих в Беларуси, а также наличие мутационно-дрейфового равновесия и панмиксии.

В результате комплексного генетического анализа, в том числе с анализом варибельности копий гена *Amy2b* отмечен факт гибридизации волка и собаки в дикой природе.

Впервые на территории СНГ проведено системное исследование генетического полиморфизма представителей семейства Псовые, разработан и внедрен методический инструментарий для его применения в криминалистике.

Приведенные в диссертации результаты можно классифицировать как новые, научно и методически обоснованные, и имеющие выраженное не только фундаментальное, но и практическое значение. Свидетельством тому является наличие двух патентов на изобретение и 8 методик, успешно применяемых в судебно-экспертной практике Республики Беларусь.

Учитывая обоснованность и достоверность положений настоящей работы, основные ее результаты могут быть использованы научными учреждениями, природоохранными службами и в системе ведения охотничьего хозяйства при мониторинге состояния и численности диких стай, при осуществлении ветеринарно-санитарного контроля за соблюдением правил содержания домашних животных, при разработке генетических технологий разведения.

6. Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

Основные результаты диссертации изложены в 28 печатных работах (общий объем 14,66 авт. листа), в том числе 5 статей – в изданиях, соответствующих п. 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (объем 4,04 авт. листа), 10 публикаций

– в других журналах, сборниках материалов научных конференций и симпозиумов, а также 3 тезиса докладов. В виде отдельных изданий опубликованы 8 методик для практикующих судебных экспертов (9,07 авторских листа). Получено 2 патента на изобретение.

7. Соответствие оформления работы диссертации требованиям ВАК.

Диссертация имеет традиционную структуру, включает в себя перечень сокращений и обозначений, введение, общую характеристику работы, шесть глав, заключение, список использованных источников и приложения (6 штук).

Текст диссертации изложен на 205 страницах. Приложения, ввиду своей обоснованной объемности, составляют 50 страниц. Список использованных источников включает 225 наименований, из которых 194 – на иностранных языках. Работа иллюстрирована 33 рисунками и содержит 28 таблиц.

Диссертация и автореферат оформлены в соответствии с предъявляемыми к ним требованиями.

8. Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Анализ диссертации и основных опубликованных научных работ без сомнений подтверждает, что диссертация написана лично А.Е. Гребенчук. Соискатель ученой степени самостоятельно планировала эксперимент, проводила подбор информативных STR-локусов и последующие лабораторные исследования, обрабатывала и анализировала информацию. Соискателем лично разработаны методические рекомендации по проведению ДНК-идентификации и ДНК-дифференциации представителей семейства Псовые, а также информационно-статистические комплексы для анализа генетических данных. Научные публикации и заявки на получение патентов подготовлены соискателем лично, под редакцией научного руководителя.

В формировании коллекции ДНК соискатель принимала непосредственное личное участие.

В основу работы положен большой фактический материал, имеется его детальная статистическая обработка. Заключительные выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными и достоверными.

Таким образом, можно заключить, что объем проведённых исследований, применяемые методологические и методические подходы, интерпретация полученных результатов и их опубликованность свидетельствуют о том, что научная квалификация автора соответствует ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика.

9. Замечания по диссертации.

В целом, детальное изучение рукописи диссертации и автореферата сформировало благоприятное впечатление, и можно поставить общую высокую оценку содержания и оформления работы. Однако, имеет место несколько вопросов и замечаний:

1) На странице 22 рукописи диссертации в первом абзаце неудачно составлено предложение: «Используя 26 STR-локусов, было обнаружено, что, генетическое разнообразие увеличилось среди скандинавских волков, но не достигло тех же уровней, что в Финляндии и в России». Такие предложения лучше перефразировать: «...было обнаружено увеличение генетического разнообразия у скандинавских волков, но не достигшее тех же уровней, что в Финляндии и России».

2) На странице 24-25 текста диссертации автор перечисляет уже имеющиеся коммерческие наборы для генотипирования, указывая на их применимость и кратко анализируя каждый. В связи с этим возник вопрос: какие основные отличия и преимущества перед имеющимися коммерческими наборами имеет разработанный автором методический инструментарий для генотипирования представителей семейства Псовые?

3) На странице 27 и 28 встречается выражение «ареал обитания вида». Следует избегать данного плеоназма, т.к. ареал – это область распространения, в которой встречается/обитает вид или группа организмов. Следовательно, достаточно употреблять выражение «ареал вида».

4) При общей хорошей графической и табличной визуализации полученных в ходе исследований данных все же следует отметить низкое разрешение карт в главе 1 (рисунки 1.1-1.4). На будущее, при подготовке публикаций рекомендуем пользоваться имеющимися в наличии ГИС-системами, которые позволяют визуализировать любые географические данные в высоком качестве.

5) Как в любой работе, в данной диссертации имеются опечатки и неточности – стр. 1, 26 и др.

6) В автореферате диссертации также хотелось бы видеть более четкую графику в рисунках 1, 2, 4 и 5.

7) В работе Molchan et al., 2023 (№ 150 в библиографическом списке диссертации) белорусскими исследователями проанализирована выборка из 100 последовательностей контрольного региона мтДНК (D-loop region), в результате чего авторы, на основании полученных выводов, утверждают о возможности значительного скрещивания волка и собаки в Беларуси. Однако, при обзоре данной публикации на стр. 38 рукописи диссертации, автором высказываются сомнения в корректности данного утверждения. В связи с этим, просьба подробнее пояснить доводы соискателя.

Принципиальных возражений по сути работы нет. Высказанные замечания носят дискуссионный и рекомендательный характер, относятся, в основном, к ее оформлению, никоим образом не умаляют очевидных научных и практических достоинств диссертации, не влияя на высокую оценку работы в целом.

Диссертация Гребенчук А.Е. основана на объемном и ценном материале. По форме, содержанию, актуальности, совокупности новых научных результатов диссертация представляет собой целостную, завершенную, самостоятельную научно-квалификационную работу на соискание ученой степени кандидата наук.

Заключение:

Анализ результатов, полученных Гребенчук Александрой Евгеньевной, их научная и практическая значимость, обоснованность и достоверность сформулированных выводов позволяют квалифицировать диссертацию как целостную, законченную работу, выполненную на высоком современном научно-методическом уровне и соответствующую требованиям главы 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий. Содержание работы соответствует специальности 03.01.07 – молекулярная генетика в отрасли «Биологические науки», по которым представлена к защите. Автореферат в полной мере отражает суть и основные положения диссертации.

Гребенчук Александра Евгеньевна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика за новые научно обоснованные результаты по молекулярно-генетическому полиморфизму в семействе Псовые, включающие:

- разработку оптимальной панели STR-локусов, пригодную для изучения популяционно-генетической структуры волка евразийского и собаки домашней, лисицы обыкновенной и собаки енотовидной;
- выявление высокого уровня гомогенности, наличия панмиксии и мутационно-дрейфового равновесия при анализе генетической структуры и генетического разнообразия диких видов семейства Псовые в Беларуси;
- создание научных основ для дифференциации подвидов и достоверной идентификации гибридных особей волка и собаки;
- выявление достоверных различий генетических характеристик диких и фермерских лисиц обыкновенных;
- доказательство отсутствия генетической интрогрессии между дикими и фермерскими лисами, что указывает на отсутствие угрозы целостности для популяции дикого вида;

- разработку оригинальных способа и тест-системы для установления видового происхождения биологических образцов волка (включая подвид собака домашняя), лисицы обыкновенной, собаки енотовидной и песца обыкновенного, а также метода ДНК-дифференциации биологических образцов волка евразийского и собаки домашней;
- разработку информационно-статистических комплексов для анализа генетических данных псовых, что минимизирует риски экспертных ошибок субъективного характера;
- разработку методического инструментария для криминалистических исследований образцов с мест правонарушений в отношении объектов животного мира.

Полученные Александрой Евгеньевной результаты вносят весомый вклад в развитие зоологии и молекулярной генетики, необходимы при исследовании процессов и последствий гибридизации, расширении методического инструментария для криминалистики и решения судебно-экспертных задач, а также решения проблем сохранения, управления и устойчивого использования биологического разнообразия диких животных.

Заведующий лабораторией ихтиологии
Государственного научно-производственного
объединения «Научно-практический центр
Национальной академии наук Беларуси по
биоресурсам», кандидат биологических наук,
доцент

Е.С. Гайдученко

27.05.2026 г.

