

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу

Гребенчук Александры Евгеньевны

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

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.07 – молекулярная генетика

Соответствие диссертации специальностям и отрасли науки, по которым она представлена к защите со ссылкой на область исследования паспорта соответствующей специальности, утвержденного ВАК.

По направлению исследований, использованным методам и полученным результатам тема диссертации соответствует специальности 03.01.07 – молекулярная генетика, отрасли биологических наук и паспорту заявленной специальности, в частности пунктам 7. Повторяющиеся последовательности ДНК, транспозоны, ретротранспозоны. Их использование в молекулярно-генетических исследованиях; 8. ДНК маркеры. Методы молекулярно-генетического картирования геномов; 9. Молекулярные механизмы эволюции геномов, генетический полиморфизм; 12. Секвенирование ДНК, генов, геномов; 19. ДНК-типирование микроорганизмов, растений и животных.

Актуальность темы диссертации.

В Республике Беларусь представители семейства псовые распространены достаточно широко. К нему относятся свободно живущие виды – волк евразийский, лисица обыкновенная, собака енотовидная, а также мало представленный вид шакал золотистый. В семейство входят одомашненные виды – песец обыкновенный, черно-бурая морфа лисицы обыкновенной и собака, которая считается подвидом волка обыкновенного и наиболее многочисленна на территории страны.

Представители семейства часто являются объектом правонарушений, в связи с чем возникает необходимость идентификации биологического материала этих видов для криминалистических целей. Наиболее современным и информативным методом идентификации биологического материала животных является ДНК-анализ. Для его успешного применения необходимо разработать панели молекулярных маркеров, позволяющие с высокой точностью идентифицировать представителей семейства псовые, включая идентификацию

на уровне вида, подтвердить воспроизводимость и достоверность получаемых результатов и внедрить оптимальный метод в практику судебных экспертиз. В этом отношении представленное исследование актуально, так как оно направлено на решение этих важных задач. Ранее необходимые популяционные исследования представителей семейства псовых, распространенных на территории Беларуси, с применением молекулярных методов ДНК-идентификации не проводились. Выполненное исследование позволило получить с применением молекулярно-генетических маркеров научно-обоснованные результаты о генетическом разнообразии волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной и ее черно-бурой морфы, собаки енотовидной, песца обыкновенного, что дало возможность решить важную и актуальную задачу криминалистических исследований – разработать методические инструменты для применения методов ДНК-идентификации биологического материала представителей семейства псовых в криминалистической практике.

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

Результаты диссертационной работы являются новыми и получены автором впервые. Автором впервые в Беларуси проведено исследование генетического разнообразия с использованием STR-маркеров представителей семейства псовые: волка евразийского и собаки домашней, лисицы обыкновенной, песца обыкновенного и собаки енотовидной. Для выполнения исследования было апробировано 70 STR-маркеров, из которых были отобраны наиболее информативные и высокоэффективные для целей идентификации и дифференциации представителей семейства на внутри- и межвидовом уровне. Разработан метод определения численного значения копий гена *Amy2b*, что позволило дифференцировать волка европейского и собаку домашнюю, а также выявить гибридных особей между подвидами, и определить, что частота их встречаемости составляет 6,36 %.

Разработан 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), что создает возможность достоверного установления видовой, подвидовой, половой принадлежности и индивидуального тождества биологического материала животных с минимальными рисками экспертных ошибок

субъективного характера. Данные результаты имеют важное практическое значение.

Ранее подобных исследований в стране проведено не было.

Положения, выносимые на защиту, отражают основные научные результаты, впервые полученные автором, и содержат информацию о направлении их применения. В частности, на основе определения параметров генетического разнообразия еотовидной собаки ($H_o = 0,665$, $H_e = 0,670$, $F_{ST} = 0,0148$) представлен вывод о существовании единой популяции на занимаемой территории. Определена принадлежность обитающих в стране особей к центральноевропейской популяции.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы и достоверны. Они сделаны и подтверждены с помощью экспериментальных данных, полученных автором с привлечением современных молекулярно-генетических методов, включая различные виды ПЦР, секвенирование, методы биоинформатики, статистические методы и др. Биологический материал, использованный для исследования генетической структуры популяций видов семейства псовые и установления внутривидовых и межвидовых различий, включает 1 043 образца. Каждый вид представлен не менее чем ста образцами, что достаточно для получения достоверных результатов. Биологический материал диких видов отобран относительно равномерно на территории Беларуси. Собака домашняя представлена разными породами, а также беспородными собаками, что делает выборку достаточной для достижения поставленных целей.

Молекулярные маркеры для идентификации представителей семейства псовые отобраны по результатам тестирования 70 локусов с разной организацией повторяющихся мотивов. Эффективность выбранных маркеров подтверждена расчетными значениями наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, коэффициентами инбридинга и др. Проведенный филогенетический и кластерный анализ показал, что выбранные молекулярные маркеры позволяют с высокой точностью осуществлять дифференциацию образцов на внутри и межвидовом уровне. Нуклеотидные последовательности значимых STR-локусов и их размер подтверждены секвенированием.

Проведенные экспериментальные исследования позволили сделать научно обоснованные выводы о генетической структуре популяций представителей

семейства псовые, распространенных на территории Беларуси, продемонстрировать генетические различия между видами по составу аллелей STR-локусов.

Рекомендации по практическому использованию результатов подтверждены изданием 8 методик, посвященных ДНК идентификации представителей семейства псовые с помощью молекулярных маркеров.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.

Научная значимость результатов диссертационного исследования высокая.

Показано, что 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). Установлены существенные различия генофондов собаки и волка. Обнаружена интрогрессия гена *Amy2b* собак домашних в генофонд волка евразийского (частота 6,36 %).

Показано высокое генетическое разнообразие лисицы обыкновенной на территории Беларуси при отсутствии субпопуляционной подразделенности и ее принадлежность к единой европейской популяции (процент вариаций между белорусской и шотландской выборками не превышает 4,64 %). Не выявлена генетическая интрогрессия между дикой и фермерской морфами лисицы (процент вариаций между выборками 27,44 %), что указывает на отсутствие угрозы генетической целостности дикого вида.

Установлена принадлежность енотовидной собаки, распространенной в Беларуси, к центральноевропейской популяции. Параметры генетического разнообразия енотовидной собаки (средние значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности 0,665 и 0,670, соответственно; субпопуляционный индекс фиксации аллелей 0,0148) указывают на существовании единой популяции на всей занимаемой территории.

Полученные результаты позволили разработать оптимальные панели STR-маркеров для анализа структуры популяции каждого вида. Разработана оригинальная панель из 6 STR-локусов для определения видового происхождения образцов волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной, енотовидной собаки и песца обыкновенного. Для различения подвидов волка и собаки предложено использовать численные значения количества копий гена *Amy2b*.

Практическая значимость результатов диссертации подтверждается разработкой методик ДНК-идентификации биологических образцов волка обыкновенного, собаки домашней, лисицы обыкновенной, енотовидной собаки, методики ДНК-дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней методом ПЦР в режиме реального времени, методиками применения информационно-статистического комплекса для анализа генетических данных животных видов *Canis lupus*, *Vulpes vulpes*, *Nectereus procyonoides*. Разработанные диссертантом методики включены в Реестр методических материалов в сфере судебно экспертной деятельности Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что свидетельствует о внедрении разработок в национальную правовую систему.

Результаты имеют и социальную значимость. Так, оценка генетического разнообразия свободноживущих видов представителей семейства псовых, обитающих на территории Беларуси, будет полезна для природоохранных мероприятий.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

По результатам диссертационных исследований опубликовано 28 научных работ, включая пять статей соответствующих Положению ВАК о присуждении ученых степеней и званий в Республике Беларусь. Из них четыре статьи в рецензируемых журналах опубликованы за пределами Республики Беларусь, в том числе в журналах с высоким импакт-фактором - *Animal Genetic* IF 2,5; *Russian Journal of Genetics* IF 0,5; *Vavilov journal of genetics and breeding* Q3 IF 0,98, что говорит о признании исследований на международном уровне. Список публикаций автора включает также 2 патента на изобретение и 8 методик, опубликованных отдельными изданиями. Результаты исследований представлены на международных научных конференциях, что нашло отражение в публикациях 9 материалов конференций и 3 тезисов докладов.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК.

Диссертация изложена на 205 страницах машинописного текста. Она состоит из введения, общей характеристики работы, шести глав, заключения, списка использованных источников, включающего 225 литературных источников и 28 публикаций соискателя, и шести приложений. Работа иллюстрирована 33 рисунками и 28 таблицами общим объемом 29 страниц. Диссертационная работа и автореферат оформлены в соответствии с требованиями ВАК. Содержание автореферата соответствует содержанию

диссертации.

Материал диссертации изложен хорошим научным языком, точно и логично.

Замечания по диссертации.

На Стр. 48 автор пишет «Генотипирование проводили..» и затем следует описание условий амплификации. Под термином генотипирование подразумевается более широкое понятие, а именно лабораторный метод определения индивидуальных генетических различий в ДНК особи. В связи с этим следовало употребить словосочетание «Амплификацию проводили...» вместо «Генотипирование проводили..».

Названия семейств животных по правилам русского языка пишутся со строчной буквы.

Сделанные замечания носят редакционный характер и не снижают высокий уровень оценки представленной научной работы.

Соответствие (несоответствие) научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Диссертационная работа «Анализ молекулярно-генетического полиморфизма в семействе Псовые (*Canidae*) для решения судебно-экспертных задач» соответствует требованиям, установленным главой 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий ВАК, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Гребенчук Александра Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.07 – молекулярная генетика за научно обоснованные экспериментальные и теоретические результаты, включающие:

установление уровня генетического разнообразия белорусской природной популяции волка евразийского;

определение отсутствия субпопуляционной подраздельности лисицы обыкновенной на территории Беларуси и угрозы генетической целостности дикого вида;

оценку параметров генетического разнообразия енотовидной собаки, распространенной в Беларуси и установление ее принадлежности к центральноевропейской популяции;

разработку панели высокоэффективных молекулярных маркеров, позволяющих достоверно дифференцировать видовую принадлежность

биологического материала волка евразийского, собаки домашней, лисицы обыкновенной и ее черно-бурой морфы, собаки енотовидной, песца обыкновенного;

разработку метода определения численного значения копий гена *Amy2b*, что позволило дифференцировать подвиды волка и собаки и установить интрогрессию на уровне 6,36 % генетического материала со стороны собак в генофонд волка евразийского;

разработку методик ДНК-генотипирования представителей семейства псовые и специализированных тест-систем (CPlex, NPlex, VPlex, CDPlex и Canis-RT), позволяющих достоверно устанавливать видовой статус, половую принадлежность и индивидуальность биологического материала представителей семейства псовые для решения криминалистических задач.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией
Государственного научного учреждения
«Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси»

О.Ю. Урбанович

20.05.2026 г.

Адрес: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

Телефон: +375 017 379-91-80.

Адрес электронной почты: O.Urbanovich@igc.by

