

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Универсальная панель STR-локусов для исследования полиморфизма вида *Canis lupus* и криминалистической идентификации собаки и волка

А.Е. Гребенчук¹✉, И.С. Цыбовский²

¹ Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Беларусь

² Республиканское унитарное предприятие «БелЮрОбеспечение», Минск, Беларусь

✉ iamsanya94@mail.ru

Аннотация. Коммерческие панели микросателлитных (STR) локусов предназначены для работы с ДНК собаки домашней (*Canis lupus familiaris*), в связи с чем при генотипировании волка обыкновенного (*Canis lupus lupus*) большинство маркеров показывают существенные отклонения от равновесия Харди–Вайнберга и имеют низкий показатель информативной ценности, что осложняет их использование в судебной экспертизе. Целью настоящего исследования стал подбор STR-маркеров, которые одинаково эффективно отображают популяционный полиморфизм волка и собаки, с последующим созданием универсальной панели для дифференциации и идентификации особей волка и собаки в криминалистике. На основе исследования полиморфизма 34 STR-локусов сконструирована панель Cplex из 15 аутосомных локусов и двух локусов половой принадлежности, которая одинаково применима для идентификации волка и собаки. Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) между выборками выявил достоверные значения дифференциации ($F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$), что позволяет использовать панель для дифференциации образцов волка обыкновенного и собаки домашней. Впервые в судебной экспертизе объектов животного происхождения в Республике Беларусь рассчитаны коэффициенты подразделенности популяции (θ -value) для каждого из 15 STR-локусов разработанной тест-системы. Показано, что значения частот генотипов, усредненные по всем исследованным животным без учета и с учетом θ -value, различаются на три порядка ($3.39 \cdot 10^{-17}$ и $4.71 \cdot 10^{-14}$ соответственно). Применение коэффициентов подразделенности популяции позволит оперировать наиболее достоверными результатами экспертного идентификационного исследования. Предложенная тест-система валидирована в соответствии с протоколом Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. Создан информационно-статистический комплекс для автоматизации обсчета генетических данных волка обыкновенного и собаки домашней в судебной экспертизе, утверждены две методики для практикующих судебных экспертов. Методические разработки успешно применяются в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, жестокого обращения с животными и других правонарушений в Республике Беларусь. Ключевые слова: микросателлиты; полиморфизм; дифференциация; идентификация; собака домашняя; волк обыкновенный; судебная экспертиза объектов животного происхождения.

Для цитирования: Гребенчук А.Е., Цыбовский И.С. Универсальная панель STR-локусов для исследования полиморфизма вида *Canis lupus* и криминалистической идентификации собаки и волка. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(1):98-107. DOI 10.18699/vjgb-24-12

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. Hrebianchuk¹✉, I.S. Tsybovsky²

¹ Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² BelJurZabespjachjenne, Minsk, Belarus

✉ iamsanya94@mail.ru

Abstract. Commercial panels of microsatellite (STR) loci are intended for DNA analysis of the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and, therefore, when genotyping the Grey wolf (*Canis lupus lupus*), most markers reveal significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium and have a low informative value, which complicates their use in a forensic examination. The aim of this study was to select STR markers that equally effectively reflect population polymorphism in the wolf and the dog, and to create a universal panel for the identification of individuals in forensic science. Based on the study of polymorphisms of 34 STR loci, a Cplex panel of 15 autosomal loci and two sex loci was developed, which is equally suitable for identifying wolves and dogs. Analysis of molecular variance (AMOVA) between samples revealed significant differentiation values ($F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$), which allows the panel to be used for differentiating between wolf and dog samples. For the first time in the forensic examination of objects of animal origin in the Republic of Belarus, population subdivision coefficients (θ -values) were calculated for each of the 15 STR loci of the test system being reported. It was shown that the values of the genotype frequency, when averaged over all studied animals without and with considering the θ -value, differ by three orders of magnitude ($3.39 \cdot 10^{-17}$ and $4.71 \cdot 10^{-14}$, respectively). The use of population subdi-

vision coefficients will provide the researcher with the most relevant results of an expert identification study. The test system was validated in accordance with the protocol of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. A computational tool was developed to automate the analysis of genetic data on the wolf and dog in the forensic examination; two guides were approved for practicing forensic experts. This methodology is being successfully used in expert practice in investigating cases of illegal hunting, animal abuse and other offenses in the Republic of Belarus.

Key words: microsatellites; polymorphism; differentiation; identification; *Canis lupus familiaris*; *Canis lupus lupus*; wildlife forensic science.

For citation: Hrebianchuk A.E., Tsybovsky I.S. A universal panel of STR loci for the study of polymorphism of the species *Canis lupus* and forensic identification of dog and wolf. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(1):98-107. DOI 10.18699/vjgb-24-12

Введение

В Республике Беларусь, согласно статистическим данным Министерства лесного хозяйства (2021), численность волка (*Canis lupus lupus*) за последние пять лет стабилизировалась и находится в пределах 1530–1630 особей, что является одним из лидирующих показателей среди стран Европы. При этом лицензионная охота на волка в Беларуси разрешена круглый год и на всех особей, независимо от пола и возраста. Вместе с тем охота на охраняемых природных территориях и охота без путевки приводят к возбуждению уголовных дел и, как следствие, назначению судебной экспертизы.

По сводкам Министерства жилищно-коммунального хозяйства, в Беларуси только за год уничтожается около 80 тыс. бродячих кошек и собак, и это число растет, а точное количество собак неизвестно. Особый статус собаки (*Canis lupus familiaris*) среди сельскохозяйственных и домашних животных определяется тем, что это одно из наиболее распространенных «животных-компаньонов». Активное использование человеком собак в качестве живого «средства» при реализации собственных целей находит отражение и в «криминальных» аспектах, сопутствующих развитию социума.

Естественная история европейских популяций волка (*C. lupus lupus*) характеризовалась сильным сокращением числа особей за последние несколько сотен лет (Boitani, 2003). Снижение численности, фрагментация популяции и нарушение потока генов являются хорошо известными триггерами генетического обеднения и увеличения инбридинга в естественных популяциях, что также приводит к увеличению риска вымирания волков, как и многих других видов. Пример такой ситуации был зафиксирован для волков Италии, у которых значения генетического разнообразия, определяемые уровнем гетерозиготности, были явно ниже аналогичных в популяциях из России, Аляски и Канады (Godinho et al., 2011).

Интенсивный отстрел волка может привести к замещению вида гибридами волка и собаки. В последнее время проблема гибридизации между волками и свободноживущими собаками в Европе стала основной темой во многих исследовательских программах (Stronen et al., 2022).

Основная сложность генетической дифференциации волка и собаки состоит в том, что ДНК-маркеры, уникальные как для волка, так и для собаки, не обнаружены. Сравнение геномов собаки и волка показало 99 % сходство, что лишний раз свидетельствует об их общем происхождении (Freedman, Wayne, 2017).

Как правило, исследование популяций волка выстраивается по типичной схеме: использование локусов, реко-

мендованных Международным обществом по изучению генетики животных (ISAG), с расчетом статистических показателей распределения аллелей данных локусов и оценкой представленности аллелей в популяции. В связи с высоким уровнем идентичности геномов волка и собаки, диапазоны аллелей локусов весьма схожи, поэтому речь о дифференциации особей с помощью отобранных локусов можно вести только при выявлении генетической дифференциации выборок путем статистической обработки результатов генотипирования (Halverson, Basten, 2005; Fan et al., 2016).

Разработанные панели для анализа ДНК собак в большинстве своем оказываются неприменимы для исследования ДНК волка по причине несоответствия равновесию Харди–Вайнберга и наличия нуль-аллелей у ДНК-маркеров. В то же время при подборе маркеров для анализа ДНК волка обыкновенного ученые, как правило, не учитывают возможность применения отобранных маркеров на инбредной популяции собак, что приводит к невозможности использования этих маркеров одновременно для идентификации волка и собаки в криминалистических исследованиях.

Целью настоящей работы был подбор STR-маркеров, которые одинаково эффективно отображают популяционную структуру и полиморфизм волка обыкновенного и собаки домашней, с последующим созданием универсальной панели для идентификации и дифференциации особей в криминалистике.

Материалы и методы

Объекты исследования. Образцы волка обыкновенного и собаки домашней получены легальным путем и представлены фрагментами мышечной и хрящевой тканей волков ($n = 103$) и образцами крови, волос и буккального эпителия чистопородных собак, собак-метисов и беспородных собак ($n = 198$). Перечень наиболее представленных пород отражен в Приложении 1¹.

Выделение ДНК, амплификация и генотипирование микросателлитных локусов. ДНК из образцов мышечной и хрящевой тканей, крови и волос волков и собак выделяли по методике, основанной на высвобождении ДНК в ходе инкубации образцов биологического материала в лизирующем буфере с протеиназой K и 0.01 мМ дитиотрейтолом при 37–56 °C. Лизат подвергали процедуре очистки на силикагеле (Boom et al., 1990).

Отобранные локусы были сгруппированы в две тест-системы: 1) тест-систему, включающую преимущест-

¹ Приложения 1–6 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx5.pdf>

венно динуклеотидные локусы, рекомендованные ISAG: АНТк211, FH2054, CXX279, Ren169O18, INU055, АНТh260, INU030, FH2079, FH2848, АНТ121, АНТh171, Ren247M23, АНТh130, INRA21, АНТк253, АНТ137, Ren54P11, INU005, Ren105L03, Ren64E19, Ren162C04, и локус половой принадлежности Amelogenin (Radco, Podbielska, 2021); 2) тест-систему, включающую преимущественно тетра nukлеотидные локусы – FH2096, СРН12, СРН4, FH2004 (Caniglia et al., 2010), FH2016 (Fan et al., 2016), FH2361, PEZ17, FH2328 (van Asch et al., 2010), PEZ16, vWF.X (DeNise et al., 2004), FH2010 (Eichmann et al., 2004), FH2001 (Verardi et al., 2006), VGL3438 (Magory Cohen et al., 2013), и локусы половой принадлежности – DBX и DBY (Seddon, 2005).

Конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл составил: 10 mM tris-HCl, pH 8.6; 25 mM KCl; 2.0 mM MgCl₂; 0.2 mM каждого из dNTP; 0.2–1.0 мкМ каждого из пары праймеров; 0.15 е. а. ДНК-полимеразы; 1.5 нг/мкл BSA; 0.1 % Triton X-100 и 1–20 нг анализируемой ДНК. Амплификацию проводили на программируемых приборах термоциклического типа С1000 (BioRad, США) в следующих условиях: начальная инкубация 5 мин при 95 °С; 30 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С (30 с), отжига для всех пар праймеров при 60 °С (40 с) и элонгации при 72 °С (1 мин); финальная элонгация в течение 30 мин при 72 °С.

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Размеры выявленных аллелей (в п. н.) и соответствующих генотипов ДНК в исследуемых локусах устанавливали с использованием внутренних стандартов размера Orange 500 bp (NimaGen®, Нидерланды) и GeneScan-600 LIZ™ SizeStandard v2.0 (ThermoFisher Scientific, США), а также программного пакета GeneMapper ID-X v1.6.

Статистический анализ данных. Поскольку неверное отнесение животных к той или иной выборке искажает расчеты, основанные на анализе показателей генетического разнообразия (Galinskaaya et al., 2019), прежде всего проводили кластерный анализ данных генотипирования волков и собак по исследованным локусам. Популяционную структуру определяли с использованием алгоритма Монте-Карло по схеме марковских цепей с помощью программы STRUCTURE v.2.3.4 и с использованием модели Admixture (Pritchard et al., 2000) с дальнейшим выявлением истинного количества кластеров методом Эванно (Evanno et al., 2005). Выбор стартовой точки марковской цепи проводили в течение 500000 итераций с последующим построением марковской цепи в течение 1000000 итераций для предполагаемого числа групп в выборке K , от 1 до 10, в шести повторах для каждой величины K . Оценку кластеризации в совокупном массиве волков и собак методами невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) и присоединения ближайших соседей (NJ) и построением соответствующих дендрограмм осуществляли в программе MEGA v.11.0.10. Для визуализации генетической структуры выполняли многомерный анализ по матрице генетических дистанций методом РСoA в макросе GenAlEx v.6.5 (Peakall, Smouse, 2006, 2012).

Расчет частот встречаемости аллелей STR-локусов, значений наблюдаемой (H_0) и ожидаемой гетерозиготности (H_E) и оценку соответствия равновесию Харди–Вайнберга производили с использованием программного пакета Cervus v.3.0.7 (Kalinowski et al., 2007). Возможные ошибки в интерпретации генетических профилей, нуль-аллелей и артефактов ПЦР выявляли с помощью программы Micro-Checker v.2.2.1 (van Oosterhout et al., 2004).

Анализ молекулярной дисперсии и оценку коэффициентов инбридинга выполняли в программе Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005). Принадлежность особи к выборке (Assignment Test) при использовании отобранных локусов устанавливали со статистическим макросом GenAlEx v.6.5. Показатели информативной ценности (polymorphism information content, PIC) отобранных STR-локусов были рассчитаны с помощью программного продукта Cervus v.3.0.7.

Секвенирование аллелей локусов. Для выявления возможных микровариантов последовательностей, а также для перевода в тандемное исчисление аллелей, принятого в криминалистике, определяли первичную структуру аллелей путем секвенирования методом Сэнгера (Sanger et al., 1977). Нуклеотидные последовательности аллелей каждого из STR-локусов и локусов половой принадлежности устанавливали в прямом и обратном направлениях. Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer с использованием набора для секвенирования “BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов выполнен на основе программы BioEdit v.7.0.5.3 (Hall et al., 2011). Последовательности каждого локуса, имеющие минимальный и максимальный молекулярные размеры аллелей, внесены в базу данных GenBank (Benson et al., 2005) с присвоением соответствующих номеров доступа.

Результаты и обсуждение

Апостериорный анализ результатов STRUCTURE выявил для совокупного массива генотипов волка и собаки максимальное значение тестовой статистики ΔK при $K = 2$, что свидетельствует о существовании двух генетических кластеров в анализируемой выборке животных: волка обыкновенного (зеленый кластер) и собаки домашней (красный кластер) (рис. 1, Приложение 2). При определении популяционной структуры выборок волков и собак отдельно друг от друга кластер из образцов волка оставался гомогенным; отсутствие кластеризации внутри популяции волка при использовании STR-локусов было ранее показано исследователями в Европе (Aspi et al., 2006; Sastre et al., 2011; Дан et al., 2016).

Для отдельного анализа STRUCTURE в выборке собак были сформированы четыре группы: беспородных собак ($n = 78$) и трех породных групп: молоссов ($n = 32$), самоедов ($n = 66$) и овчарок ($n = 22$). Максимальное значение ΔK при $K = 2$ указывает на формирование двух кластеров (Приложения 3 и 4), один из которых соответствует овчаркам, тогда как породные группы самоедов и молоссов не выделяются и, более того, не отличаются от группы беспородных собак.

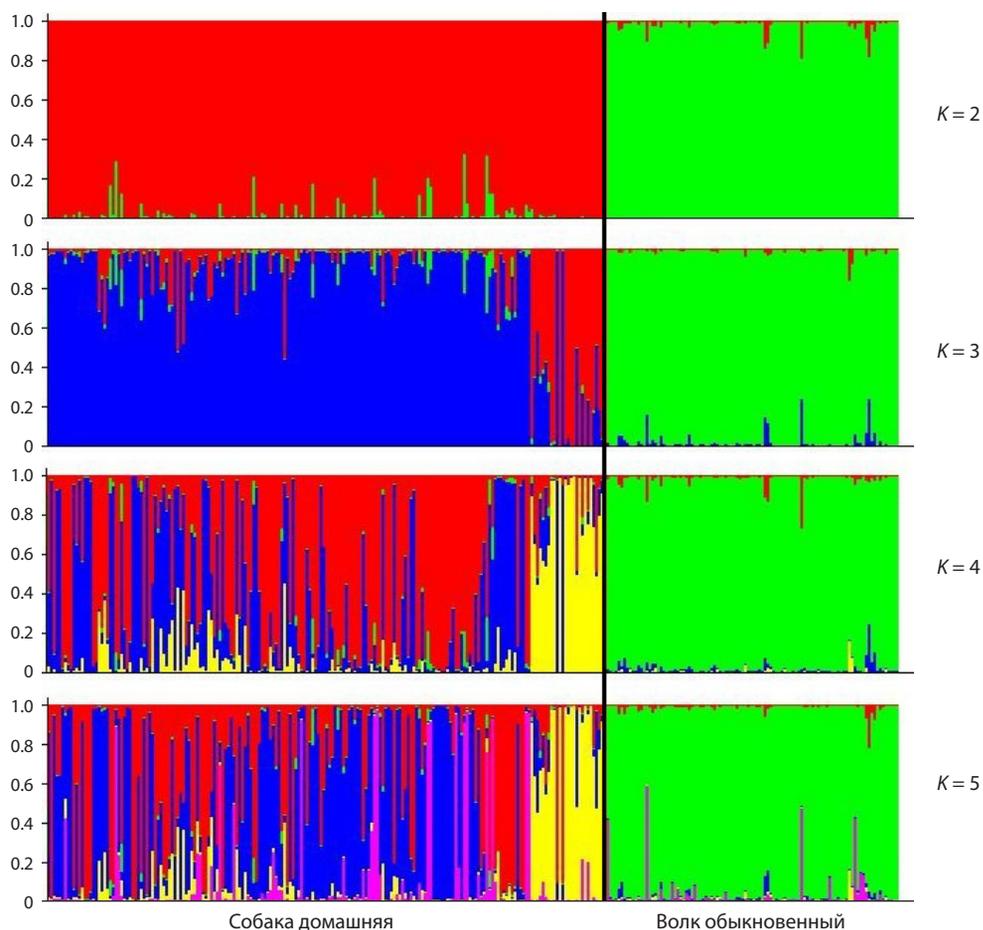


Рис. 1. Результаты кластерного анализа выборок волка и собаки, выполненного в программе STRUCTURE для наиболее вероятного значения числа исходных генетических кластеров $K = 2-5$, отсортированные по выборкам.

В то же время при оценке кластеризации в совокупном массиве волков и собак методами невзвешенных парно-групповых средних (UPGMA) и присоединения ближайших соседей (NJ) и построением соответствующих дендрограмм в выборке собак выделяются четыре кластера различного иерархического уровня. Наибольшую схожесть демонстрируют породная группа молоссов и беспородные собаки. С ними соседствует породная группа самоедов, и эти две группы отделяются от группы овчарок. Поскольку обе дендрограммы показали схожую структуру, то в Приложении 5 отображена только дендрограмма, построенная по методу UPGMA (с бутстреп-поддержкой в 10000 повторений). Следует отметить, что схожая картина кластеризации пород собак при исследовании SNP-маркеров получена другими авторами (Parker et al., 2017).

Анализ популяционной структуры волков и собак показал резкую генетическую дифференциацию между ними со средними значениями коэффициента принадлежности к собственному кластеру: $Q = 0.984$ и 0.981 соответственно. Полученные данные о дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней с использованием 34 STR-маркеров успешно согласуются с данными Коралева с коллегами (Korablev et al., 2021). Уровень дифференциации между породами собак был намного ниже, чем между волком и собакой. Значения Q изменялись от 0.457 до 0.495

для молоссов, от 0.451 до 0.476 для самоедов и от 0.740 до 0.757 для овчарок.

Результаты кластерного анализа согласуются с многомерным анализом по матрице генетических дистанций (PCoA метод), который тоже показывает четкую дифференциацию выборок волка и собаки (рис. 2). При этом овчарки выделились в отдельную группу. Это может объясняться особенностями селекции, а также быть следствием высокой гетерогенности выборок молоссов и самоедов, объединенных общим историческим происхождением (более 20 различных пород), в то время как выборка овчарок включала в себя чистопородных особей породы немецкая овчарка.

Суммарно в выборке волков обыкновенных и собак домашних с использованием двух исследованных тест-систем было идентифицировано 405 аллелей. Все локусы были полиморфными и имели от 5 (FH2096) до 26 (FH2361) аллелей на локус. Среднее количество аллелей на локус во всех выборках было относительно одинаковым – 9.402 ± 0.617 (табл. 1). Исключение составила выборка овчарок, где среднее значение на локус находилось в пределах 5.824 ± 0.328 , что может объясняться в том числе небольшим размером выборки ($n = 22$).

Максимальные показатели гетерозиготности были получены для выборки волка: значения наблюдаемой и ожи-

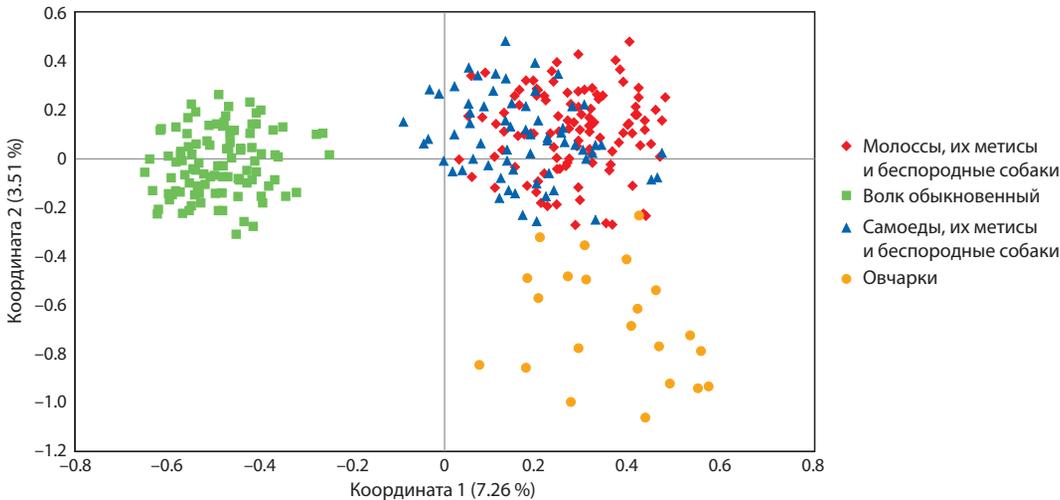


Рис. 2. Диаграмма результатов PCoA анализа на основе матрицы парных F_{ST} значений для выборок волка обыкновенного и собаки домашней.

Таблица 1. Средние значения уровня полиморфизма исследованных локусов в выборках волков обыкновенных и трех исторических породных групп собак

Выборка	N_a	N_e	H_o	H_E
Волк обыкновенный	9.265 ± 0.476	5.258 ± 0.306	0.730 ± 0.017	0.786 ± 0.013
Молоссы, их метисы и беспородные собаки	9.706 ± 0.575	4.916 ± 0.293	0.656 ± 0.017	0.768 ± 0.016
Самоеды, их метисы и беспородные собаки	9.235 ± 0.560	5.212 ± 0.312	0.688 ± 0.018	0.782 ± 0.015
Овчарки и их метисы	5.824 ± 0.328	2.992 ± 0.197	0.556 ± 0.029	0.617 ± 0.025

Примечание. N_a – число аллелей на локус; N_e – эффективное число аллелей на локус; H_o – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность.

даемой гетерозиготности составили 0.730 и 0.786 соответственно (см. табл. 1). В выборках собак более высокие значения ожидаемой гетерозиготности по сравнению с наблюдаемой с большой вероятностью указывают на наличие инбридинга вследствие искусственного отбора и генетического дрейфа, которые могут необратимо удалять аллели из популяции, что приводит к эффекту, существенно снижающему разнообразие (Galinskayaa et al., 2019). Мутационный процесс противодействует генетическому дрейфу, но вследствие жесткой направленности отбора при выведении пород собак сложно добиться равновесия генетических процессов ввиду элиминации из разведения особей с выявленными мутациями в том или ином признаке. Наивысшие из полученных показателей гетерозиготности и эффективного числа аллелей выявлены в выборке волка, что свидетельствует о естественном развитии и наличии мутационно-дрейфового равновесия в природной популяции.

Анализ профилей динуклеотидных локусов требует особого внимания, поскольку на электрофореграммах могут обнаруживаться фрагменты, не относящиеся к истинным аллелям и являющиеся «статтер»-продуктами. Количество «статтер»-продуктов обычно возрастает с увеличением длины аллеля. При анализе генотипов с использованием программы Micro-Checker из 20 исследованных динуклеотидных маркеров три (INU055, Ren169O18 и Ren64E19) показали высокую вероятность ошибок генотипирования и были исключены из дальнейшего анализа.

Анализ распределения аллелей двух локусов (АНТ121 и АНТк211) показал наличие большого количества нуль-аллелей в трех выборках, включая выборку волка. В локусах АНТ137 и INRA21 выявлено высокое содержание нуль-аллелей в двух выборках собак; восемь локусов (АНТh130, АНТh260, CXX279, FH2848, Ren105L03, Ren162C04, Ren247M23 и Ren54P11) показали достаточно высокое содержание нуль-аллелей (от 5.7 % в выборке молоссов в локусе FH2848 до 12.6 % в локусе CXX279 у овчарок). Данные локусы были также исключены из дальнейшей работы по конструированию универсальной криминалистической панели.

При анализе картины распределения частот аллелей в конкретных локусах особое внимание уделялось локусам с существенным преобладанием мажорных аллелей. Различия в частотах мажорных аллелей могут быть полезны для дифференциации волков и собак посредством микросателлитного анализа, однако существенное преобладание одного аллеля может влиять на уровень достоверности идентификации. По причине выраженного доминирования мажорных аллелей из дальнейшего анализа исключены локусы INU030, INU005, АНТк171 и АНТк253.

Большинство исследованных локусов в выборках волков и собак находились в равновесии Харди–Вайнберга ($p > 0.05$): АНТh171, АНТк253, СРН12, СРН4, FH2001, FH2004, FH2010, FH2016, FH2096, FH2328, FH2361, INU005, INU030, INU055, PEZ16, PEZ17, Ren169O18, Ren64E19, VGL3438 и vWF.X. Два локуса, FH2054 и

Таблица 2. Средние значения показателей гетерозиготности для волка и собаки и показателей F-статистик Райта для совокупной выборки *Canis lupus*

Лocus	H_O	H_E	H_O	H_E	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
	Собака домашняя		Волк обыкновенный				
FH2016	0.783	0.894	0.832	0.886	0.129	0.033	0.158
FH2079	0.555	0.664	0.612	0.656	0.221	0.093	0.293
VGL3438	0.751	0.858	0.709	0.784	0.130	0.029	0.155
FH2361	0.793	0.852	0.861	0.821	0.003	0.032	0.035
FH2054	0.792	0.822	0.760	0.781	0.098	0.077	0.167
FH2001	0.737	0.804	0.612	0.744	0.054	0.025	0.078
FH2328	0.763	0.865	0.718	0.743	0.065	0.058	0.119
FH2004	0.767	0.803	0.784	0.885	0.081	0.067	0.142
CPH12	0.571	0.707	0.553	0.650	0.162	0.060	0.212
FH2010	0.641	0.713	0.767	0.777	0.022	0.070	0.090
PEZ17	0.675	0.797	0.777	0.776	0.109	0.068	0.170
PEZ16	0.611	0.793	0.786	0.825	0.145	0.120	0.247
CPH4	0.595	0.611	0.767	0.837	0.103	0.158	0.245
FH2096	0.414	0.524	0.485	0.603	0.174	0.133	0.284
vWF.X	0.545	0.613	0.786	0.838	0.052	0.136	0.182
Среднее	0.666	0.755	0.721	0.774	0.103	0.077	0.172

Примечание. H_O – наблюдаемая гетерозиготность; H_E – ожидаемая гетерозиготность; F_{IS} – коэффициент инбридинга особей внутри выборки, F_{ST} – индекс фиксации аллелей, F_{IT} – коэффициент инбридинга особей в совокупной выборке.

FH2079, отклонялись от равновесия ($p = 0.005$) во всех выборках, однако при использовании поправки Бонферрони p -значения перестали быть статистически значимыми. В 12 локусах выявлено статистически значимое отклонение от равновесия Харди–Вайнберга хотя бы в одной выборке, что может быть особенностью проявления локусов и объясняться наличием нуль-аллелей.

Индекс фиксации аллелей (F_{ST}) варьировал от 0.025 (FH2001) до 0.158 (CPH4) и в среднем по всем локусам составил 0.077. Самые высокие значения F_{IS} были характерны для локусов FH2079, FH2096 и CPH12 (0.221, 0.174 и 0.162 соответственно). В целом для панели из 15 отобранных локусов коэффициенты инбридинга F_{IS} и F_{IT} составляли 0.103 и 0.172 соответственно (табл. 2).

Значения F_{IS} в выборке волков в большинстве исследованных локусов были достаточно близки к нулю, что в совокупности с высокими значениями гетерозиготности может указывать на наличие в популяции панмиксии (Galinskaya et al., 2019).

Ключевым фактором в криминалистическом исследовании может быть правильное отнесение образца к волку обыкновенному или собаке домашней. Для оценки возможности дифференциации волка и собаки с использованием отобранных микросателлитных локусов был проведен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA). Результаты AMOVA показали, что доля вариаций между выборками волка и собаки составила 8.28 %, а внутри выборки – 91.72 %. Компоненты дисперсии среди популяции были значимыми для всех изученных локусов (Приложение 6), что говорит о наличии дифференциации выборок волка и собаки. Локусы vWF.x, FH2096 и CPH4

объясняют 21.11, 19.34 и 14.40 % генетической изменчивости между выборками соответственно, а для FH2079 и FH2016 получена самая низкая вариабельность среди популяций (2.45 и 2.20 % соответственно).

Согласно интерпретации Райта (Wright, 1978), диапазон значений F_{ST} от 0.15 до 0.25 указывает на умеренное дифференцирование. В то же время значения, находящиеся в диапазоне 0.00–0.05, свидетельствуют о слабом, но заслуживающем внимания различии выборок. В силу того, что у гипервариабельных маркеров с большим количеством аллелей значения F_{ST} могут быть существенно ниже, чем у маркеров с небольшим количеством аллелей, более важен вопрос об обнаружении значимой генетической дифференциации волков и собак по совокупности отобранных STR-локусов (Hedrick, 2000). Анализ AMOVA между выборками выявил значимую дифференциацию между волком и собакой (парное значение $F_{ST} = 0.0828$, $p < 0.05$).

Графическим подтверждением значимой дифференциации волка и собаки с использованием отобранных локусов служит анализ принадлежности к определенной выборке (Assignment test). В его основе лежит расчет значения вероятности наличия генотипа определенной особи в выборке, из которой он был отобран, и его сравнение со значением вероятности этого же генотипа в другой выборке. В результате данных расчетов особь относится к той выборке, для которой получена наибольшая вероятность (рис. 3).

Расчет генетической принадлежности к истинной выборке показал высокую консолидированность волков и собак: 100 % всех исследованных животных были генети-

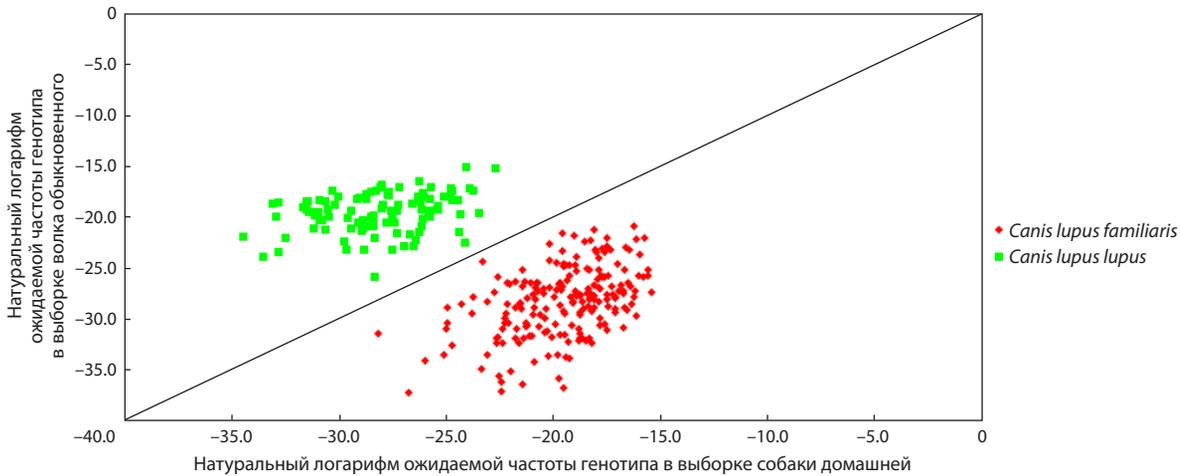


Рис. 3. График генетического отнесения образца к исследуемой выборке (графическая интерпретация анализа Assignment test).

чески отнесены к собственным кластерам. При этом разница модулей натуральных логарифмов ожидаемых частот генотипов особей, в случае их принадлежности к собственной выборке или к альтернативной выборке, имела высокое значение: для особей волка обыкновенного разница в среднем составляла 8.722, а для собаки домашней – 8.584. Высокие значения разницы модулей логарифмов ожидаемых частот генотипов подтверждают успешность дифференциации волка обыкновенного и собаки домашней с использованием предложенных локусов.

Важным критерием в криминалистике является адекватная интерпретация значения достоверности идентификационного исследования. Для расчета вероятности случайного совпадения генотипов необходимы соответствующая референтная база и корректное применение консервативной процедуры расчета (Buckleton et al., 2016). Проведенное исследование массивов генотипов образцов волков и собак позволило рассчитать частоты встречаемости аллелей и поправки на генетическую подразделенность популяций волков и собак, обитающих на территории Беларуси.

Сложная социальная организация жизни у волка наряду с четкой селекционной работой с породами собак приводит к формированию структурированности популяций этих животных. По этой причине для получения максимально достоверного экспертного вывода при идентификационном исследовании образца оптимально использовать частотные характеристики локусов конкретных субпопуляций, что практически невозможно в судебной экспертизе объектов животного происхождения. Альтернативным решением служит введение в расчет частоты встречаемости генотипа коэффициента подразделенности (θ -value), который учитывает наличие структурированности популяций (The Evaluation..., 1996; Buckleton et al., 2006).

Значения частот генотипов, усредненные по всем животным и рассчитанные с включением последующих исследованных локусов тест-системы без и с учетом θ -value, различаются на три порядка: $3.39 \cdot 10^{-17}$ и $4.71 \cdot 10^{-14}$ соответственно (табл. 3). Это говорит о том, что без учета коэффициента θ -value при идентификации возможна пе-

Таблица 3. Значения частоты генотипа, усредненные по всем животным, без и с использованием поправки на подразделенность популяции

Локус	θ -value	Частота генотипа	
		без учета θ -value и с включением последующего локуса	с учетом θ -value и с включением последующего локуса
FH2016	0.039	$2.08 \cdot 10^{-2}$	$3.62 \cdot 10^{-2}$
FH2079	0.145	$3.31 \cdot 10^{-3*}$	$9.58 \cdot 10^{-3**}$
VGL3438	0.020	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$5.44 \cdot 10^{-4}$
FH2361	0.035	$7.19 \cdot 10^{-6}$	$3.39 \cdot 10^{-5}$
FH2054	0.081	$4.26 \cdot 10^{-7}$	$3.61 \cdot 10^{-6}$
FH2001	0.031	$3.23 \cdot 10^{-8}$	$3.38 \cdot 10^{-7}$
FH2328	0.065	$1.81 \cdot 10^{-9}$	$3.04 \cdot 10^{-8}$
FH2004	0.090	$8.97 \cdot 10^{-11}$	$2.96 \cdot 10^{-9}$
CPH12	0.102	$1.26 \cdot 10^{-11}$	$6.27 \cdot 10^{-10}$
FH2010	0.070	$1.46 \cdot 10^{-12}$	$9.84 \cdot 10^{-11}$
PEZ17	0.080	$1.05 \cdot 10^{-13}$	$1.16 \cdot 10^{-11}$
PEZ16	0.170	$6.07 \cdot 10^{-15}$	$1.91 \cdot 10^{-12}$
CPH4	0.173	$8.54 \cdot 10^{-16}$	$4.92 \cdot 10^{-13}$
FH2096	0.131	$2.25 \cdot 10^{-16}$	$1.76 \cdot 10^{-13}$
vWFX	0.192	$3.39 \cdot 10^{-17}$	$4.70 \cdot 10^{-14}$

Примечание. Локусы приведены в порядке увеличения F_{ST} . * Здесь и далее произведение частоты генотипа предыдущих и данного локусов; ** здесь и далее произведение частоты генотипа предыдущих и данного локусов.

реоценка (занижение) частоты генотипа, что в судебной экспертизе приведет к неправоначальному завышению достоверности экспертного исследования.

Анализ показателей информативной ценности локусов (PIC) выявил, что все отобранные локусы в объединенной выборке собак, согласно (Botstein et al., 1980), являются высокоинформативными для исследования ДНК как собаки домашней, так и волка обыкновенного (табл. 4).

Таблица 5. Характеристика микросателлитных локусов тест-системы CPlax

Локус	Выявленный диапазон, п. н.	Тип и диапазон тандема	Номер доступа GenBank	
			Аллель минимальной длины	Аллель максимальной длины
DBX	246	–	OQ216490	
DBY	117	–	OQ216491	
FH2096	88–108	(AATG) _{5–10}	OQ216492	OQ216493
vWF.X	133–199	(AGGAAT) _{5–16}	OQ216494	OQ216495
CPH4	138–152	(CA) _{14–22}	OQ216496	OQ216497
FH2079	260–292	(TGGA) _{6–14}	OQ216498	OQ216499
CPH12	180–200	(AC) _{5–19}	OQ216500	OQ216501
FH2010	215–239	(GAAT) _{7–13}	OQ216502	OQ216503
PEZ17	190–222	(TTTC) _{11–19}	OQ216504	OQ216505
PEZ16	269–337	(GAAA) _{5–22}	OQ216506	OQ216507
FH2004	229–337	(TTCT) _{11–38}	OQ216508	OQ216509
FH2054	140–180	(ATCT) _{13–23}	OQ216510	OQ216511
VGL3438	101–145	(AAAG) _{10–20}	OQ216512	OQ216513
FH2001	124–158	(ATCT) _{7–10}	OQ216514	OQ216515
		(ATCT) _{10–14} CAACTC	OQ216516	OQ216517
FH2361	329–425	(TCTT) _{11–35}	OQ216518	OQ216519
		(TCTT) _{11–18} TC	OQ216520	OQ216521
FH2328	181–219	(AAAG) _{7–16}	OQ216522	OQ216523
		(AAAG) ₁₅ AA(AAAG) ₁	OQ216524	
FH2016	276–340	(CTTT) _{15–31}	OQ216525	OQ216526
		(CTTT) _{19–21} CT	OQ216527	OQ216528

исследованиях по делам о незаконной охоте, нападении животных на людей и домашний скот, а также по делам о жестоком обращении с животными.

Разработаны «Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных волк обыкновенный (*Canis lupus lupus*) и собака домашняя (*Canis lupus familiaris*)» и «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*)», предназначенные для практикующих судебных экспертов. Информационно-статистический комплекс содержит массивы генотипов и математический аппарат, позволяющий автоматизировать обработку данных при установлении принадлежности образца к волку обыкновенному или собаке домашней, расчете достоверности экспертного вывода в идентификационном исследовании или установлении биологического родства. Заложена также возможность ведения генотипоскопического учета биологических образцов животных биологического вида *C. lupus* в судебной экспертизе. Разработанные методики включены в Реестр судебно-экспертных методик и иных методических материалов Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, что соответствует имплементации разработки в национальную правовую систему.

Список литературы / References

- Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь. Годовой отчет о ведении лесного хозяйства. 2021 [Ministry of Forestry of the Republic of Belarus. Annual Forest Management Report. 2021 (in Russian)]
- Aspi J., Roininen E., Ruokonen M., Kojola I., Vila C. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Mol. Ecol.* 2006;15(6):1561–1576. DOI 10.1111/j.1365-294X.2006.02877.x
- Benson D.A., Karsch-Mizrachi L., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2005;34:D16–D20. DOI 10.1093/nar/gkj157
- Boitani L. Wolf Conservation and Recovery. Chicago: Univ. of Chicago Press, 2003;317–340
- Boom R.C.J.A., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., Van der Noordaa J.P.M.E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28(3):495–503. DOI 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1980;32(3):314
- Buckleton J.S., Curran J.M., Walsh S.J. How reliable is the sub-population model in DNA testimony? *Forensic Sci. Int.* 2006;157(2-3): 144–148. DOI 10.1016/j.forsciint.2005.04.004
- Buckleton J.S., Bright J.A., Taylor D. Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press, 2016. DOI 10.4324/9781315371115
- Caniglia R., Fabbri E., Greco C., Galaverni M., Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010;4(5):334–338. DOI 10.1016/j.fsigen.2009.10.012

- Dan M., Šnjegota D., Veličković N., Stefanović M., Obreht Vidaković D., Čirović D. Genetic variability and population structure of grey wolf (*Canis lupus*) in Serbia. *Russ. J. Genet.* 2016;52(8):821-827. DOI 10.1134/S1022795416080044
- DeNise S., Johnston E., Halverson J., Marshall K., Rosenfeld D., McKenn S., Sharp T., Edwards J. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.* 2004;35(1):14-17. DOI 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x
- Eichmann C., Berger B., Reinhold M., Lutz M., Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *Int. J. Leg. Med.* 2004;118(6):337-342. DOI 10.1007/s00414-004-0479-7
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online.* 2005;1:47-50
- Fan Z., Silva P., Gronau I., Wang S., Armero A.S., Schweizer R.M., Ramirez O., Pollinger J., Galaverni M., Ortega Del-Vecchyo D., Du L., Zhang W., Zhang Z., Xing J., Vilà C., Marques-Bonet T., Godinho R., Yue B., Wayne R.K. Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. *Genome Res.* 2016;26(2):163-173. DOI 10.1101/gr.197517.115
- Freedman A.H., Wayne R.K. Deciphering the origin of dogs: from fossils to genomes. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2017;5:281-307. DOI 10.1146/annurev-animal-022114-110937
- Galinskayaa T.V., Schepetov D.M., Lysenkov S.N. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Russ. J. Genet.* 2019; 55(6):617-632. DOI 10.1134/S0016675819060043
- Godinho R., Llanaza L., Blanco J.C., Lopes S., Alvares F., Garcia E.J., Palacios V., Cortés Y., Tategón J., Ferrand N. Genetic evidence for multiple events of hybridization between wolves and domestic dogs in the Iberian Peninsula. *Mol. Ecol.* 2011;20(24):5154-5166. DOI 10.1111/j.1365-294x.2011.05345.x
- Hall T., Biosciences I., Carlsbad C.J.G.B.B. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2011;2(1):60-61
- Halverson J., Basten C. A PCR multiplex and database for forensic DNA identification of dogs. *J. Forensic Sci.* 2005;50(2):352-363
- Hedrick P.W. Genetics of Populations. Boston: Jones and Bartlett, 2000
- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 2007;16(5):1099-1106. DOI 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x
- Korablev M.P., Korablev N.P., Korablev P.N. Genetic diversity and population structure of the grey wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) and evidence of wolf × dog hybridisation in the centre of European Russia. *Mamm. Biol.* 2021;101(1):91-104. DOI 10.1007/s42991-020-00074-2
- Magory Cohen T., King R., Dolev A., Boldo A., Lichter-Peled A., Kahila Bar-Gal G. Genetic characterization of populations of the golden jackal and the red fox in Israel. *Conserv. Genet.* 2013;14(1):55-63. DOI 10.1007/s10592-012-0423-1
- Parker H.G., Dreger D.L., Rimbault M., Davis B.W., Mullen A.B., Carpintero-Ramirez G., Ostrander E.A. Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell Rep.* 2017;19(4):697-708. DOI 10.1016/j.celrep.2017.03.079
- Peakall R.O.D., Smouse P.E. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes.* 2006;6(1):288-295. DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537-2539. DOI 10.1093/bioinformatics/bts460
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 2000;155(2):945-959. DOI 10.1093/genetics/155.2.945
- Radko A., Podbielska A. Microsatellite DNA analysis of genetic diversity and parentage testing in the popular dog breeds in Poland. *Genes.* 2021;12(4):485. DOI 10.3390/genes12040485
- Revised Validation Guideline – Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM). *Forensic Sci. Commun.* 2004;6(3). Available from: http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2004/standards/2004_03_standards02.htm
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977;74(12):5463-5467. DOI 10.1073/pnas.74.12.5463
- Sastre N., Vila C., Salinas M., Bologov V.V., Urios V., Sánchez A., Francino O., Ramírez O. Signatures of demographic bottlenecks in European wolf populations. *Conserv. Genet.* 2011;12(3):701-712. DOI 10.1007/s10592-010-0177-6
- Seddon J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conserv. Genet.* 2005;6(1):147-149. DOI 10.1007/s10592-004-7734-9
- Stronen A.V., Aspi J., Caniglia R., Fabbri E., Galaverni M., Godinho R., Kvist L., Mattucci F., Nowak C., von Thaden A., Harmoinen J. Wolf-dog admixture highlights the need for methodological standards and multidisciplinary cooperation for effective governance of wild × domestic hybrids. *Biol. Conserv.* 2022;266:109467. DOI 10.1016/j.biocon.2022.109467
- The Evaluation of Forensic DNA Evidence / Committee on DNA Forensic Science: an Update. National Research Council. Washington D.C.: National Academy Press, 1996
- van Asch B., Alves C., Santos L., Pinheiro R., Pereira F., Gusmao L., Amorim A. Genetic profiles and sex identification of found-dead wolves determined by the use of an 11-loci PCR multiplex. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010;4(2):68-72. DOI 10.1016/j.fsigen.2009.05.003
- van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 2004;4(3):535-538. DOI 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x
- Verardi A., Lucchini V., Randi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol. Ecol.* 2006; 15(10):2845-2855. DOI 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x
- Wright S. Variability Within and Among Natural Populations. Evolution and the Genetics of Populations. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1978

ORCID

A.E. Hrebianchuk orcid.org/0000-0002-1224-3275
I.S. Tsybovsky orcid.org/0000-0002-8611-8215

Благодарности. Авторы выражают благодарность Республиканскому государственному общественному объединению «Белорусское общество охотников и рыболовов», ветеринарному центру «Друг» и государственному учреждению «Минская городская ветеринарная станция» за помощь в формировании коллекции биологических образцов.

Финансирование. Работа выполнялась на базе государственного учреждения «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь» и финансировалась Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь (номер государственной регистрации НИОК(ТР): 20190195).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.01.2023. После доработки 04.07.2023. Принята к публикации 11.07.2023.