
ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.21+636.93+639.113

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ДИКОЙ И ФЕРМЕРСКОЙ ПОПУЛЯЦИЙ ЛИСИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*VULPES VULPES*) В БЕЛАРУСИ

А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, А. С. ПАРФЕНОВА²⁾, О. Н. ЛУКАШКОВА¹⁾, И. С. ЦЫБОВСКИЙ³⁾

¹⁾Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Кальварийская, 43, 220073, г. Минск, Беларусь

²⁾Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

³⁾БелЮрОбеспечение, пр. Дзержинского, 16, 220069, г. Минск, Беларусь

Лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) является охотничьим видом, а также разводится на зверофермах для производства пушнины. Изучено генетическое разнообразие 412 особей (265 биологических образцов рыжей морфы и 147 биологических образцов черно-бурой морфы) лисицы обыкновенной. На основе исследования полиморфизма ДНК разработана панель из 12 STR-локусов и 2 локусов половой принадлежности, которая применима для идентификации биологических образцов особей дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Анализ генетической структуры вида с использованием данной тест-системы показал, что исследуемые выборки формируют два генетических кластера, анализ молекулярной дисперсии между выборками выявил достоверные значения генетической дифференциации ($F_{ST} = 0,275$; $p = 0,000$). Проведена оценка уровня генетической интрогрессии между животными, выращенными на зверофермах в Беларуси, и особями местной дикой популяции. Полученные результаты указывают на низкую вероятность генетической интрогрессии и отсутствие угрозы генетической целостности этого вида. Установлено, что 3 локуса (vWF.X, Nuct10 и CPN4) у лисицы обыкновенной являются мономорфными, причем размеры аллелей отличаются от таковых у других псовых, что дает возможность использовать эти локусы при дифференциации представителей семейства псовых и в качестве внутреннего контроля видовой

Образец цитирования:

Гребенчук АЕ, Парфенова АС, Лукашкова ОН, Цыбовский ИС. Характеристика генетической структуры дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной (*Vulpes vulpes*) в Беларуси. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023; 3:34–46.
EDN: UJJAOD

For citation:

Hrebianchuk AE, Parfionava NS, Lukashkova VM, Tsybovsky IS. Characteristics of the genetic structure of wild and farm populations of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Belarus. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;3:34–46. Russian.
EDN: UJJAOD

Сведения об авторах см. на с. 46.

Information about the authors see p. 46.

принадлежности исследуемых образцов. Разработана методика ДНК-идентификации лисицы обыкновенной, которая успешно применяется в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, нападения животных и иных правонарушений в Республике Беларусь.

Ключевые слова: лисица обыкновенная; генетическое разнообразие; микросателлиты; полиморфизм; идентификация; интрогрессия.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь (№ гос. регистрации 2019195). Авторы выражают признательность работникам республиканского государственно-общественного объединения «Белорусское общество охотников и рыболовов» и сотрудникам зверохозяйств Республики Беларусь за помощь в формировании коллекции биологических образцов.

CHARACTERISTICS OF THE GENETIC STRUCTURE OF WILD AND FARM POPULATIONS OF THE RED FOX (*VULPES VULPES*) IN BELARUS

A. E. HREBIANCHUK^a, N. S. PARFIONAVA^b, V. M. LUKASHKOVA^a, I. S. TSYBOVSKY^c

^aState Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus,
43 Kalvaryjskaja Street, Minsk 220073, Belarus

^bScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus,
25 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

^cBelJurZabesjachjenne, 1b Dziarzhynskaga Avenue, Minsk 220069, Belarus

Corresponding author: A. E. Hrebianchuk (iamsanya94@mail.ru)

The red fox (*Vulpes vulpes*) is a hunting species, and is also bred on fur farms for the production of furs. In this work, was evaluated the polymorphism of DNA from the biological material of 412 individuals (265 samples of red morph and 147 samples of silver morph) of the red fox. Based on the study of polymorphism, a panel of 12 STR loci and 2 sex loci was developed, which is applicable for the identification of biological samples of individuals from wild and farm populations of the red fox. Analysis of the genetic structure of the species using this test system showed that two genetic clusters represent the most probable number of populations. No evidence of genetic admixture between farm and wild red foxes was found, analysis of molecular variance between samples revealed significant differentiation values ($F_{ST} = 0.275$; $p = 0.000$). The level of genetic introgression between the animals grown on fur farms in Belarus and the individuals of local wild population was studied. Research results indicate a low likelihood of genetic introgression between farm and wild populations of the red fox and no threat to the genetic integrity of this species. It was established that 3 loci (vWF.X, Nyct10 and CPH4) in DNA of the red fox were monomorphic with allele sizes different from those of other canids, which indicates the possibility of their use in differentiating animals of the Canidae family and as an internal control of the species of the studied samples. The use of the test system is framed in the form of a method for DNA identifying the red fox, which is successfully used in expert practice in investigating the facts of illegal hunting, animal attacks and other cases in the Republic of Belarus.

Keywords: red fox; genetic diversity; microsatellites; polymorphism; identification; introgression.

Acknowledgements. This work was carried out with the financial support of the State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus (state registration No. 2019195). The authors express their gratitude to the employees of the republican state-public association «Belarusian Society of Hunters and Fishermen» and employees of animal farms of the Republic of Belarus for their assistance in forming a collection of biological samples.

Введение

В Беларуси лисица обыкновенная (*Vulpes vulpes*) – широко распространенный и довольно многочисленный вид (его общая численность к началу сезона охоты находится на уровне 25 000–28 000 особей¹). Однако численность лисицы обыкновенной непостоянна, и в среднем раз в 5 лет бывают ее подъемы, что определяется наличием мышевидных грызунов, особенностями погоды и другими причинами [1, р. 132]. Согласно данным Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь за сезон охоты добывается 80–90 % поголовья лисицы обыкновенной в Беларуси². Вместе с тем ежегодный отстрел не приводит к уменьшению численности, поскольку под прессом искусственного сокращения плотности этот вид может компенсировать свои потери за счет увеличения размера выводка [1, р. 134].

¹Отчет о ведении охотничьего хозяйства за 2021 год / М-во лесного хоз-ва Респ. Беларусь. Минск, 2021. 6 с.

²Там же.

В настоящее время лисица обыкновенная принадлежит к видам, которым присвоен охранный статус «вызывающие наименьшее беспокойство» [1, р. 135]. Однако даже устойчивая популяция может терять свою генетическую целостность в случае интрогрессивной гибридизации (включения генов одного вида (подвида, морфы) в генофонд другого вида (подвида, морфы)). Имеется ряд исследований хищных видов млекопитающих, популяции которых находятся под угрозой генетической интрогрессии со стороны одичавших одомашненных животных [2–4]. В Беларуси, несмотря на падение мирового спроса на меховые изделия, по-прежнему функционирует звероводство, в том числе фермерское разведение лисиц, численность которых находится в пределах 500–2500 особей³. И фермерская, и дикая популяции принадлежат к одному и тому же виду, между ними отсутствует репродуктивная изоляция. Угроза генетической целостности популяции лисицы обыкновенной в природе исходит от фермерских лисиц, проникающих в дикие популяции в качестве беглецов. Несмотря на изолированную среду содержания, особи из фермерских популяций вступают в контакт с местными дикими популяциями, потенциально влияя на них. Из-за возможного прессинга животных, разводимых человеком, важно понимать генетическую структуру диких популяций и выявлять потенциальную генетическую интрогрессию [5].

Генетическая интрогрессия между фермерскими и дикими популяциями лисицы обыкновенной становилась объектом нескольких исследований. Учеными из США [6; 7] и Канады [8] показано отсутствие влияния генофонда фермерских лисиц на генетическую целостность диких популяций. Исследователи из Польши [9] пришли к выводу, что на юго-востоке страны между животными фермерских и диких популяций имеет место невысокий уровень интрогрессии, в то время как другие ученые [5] указали на отсутствие угрозы генетической целостности этого вида в Польше.

В Беларуси популяционная генетика лисицы обыкновенной ранее не изучалась. Основная цель настоящего исследования – установить современное состояние генетического и аллельного разнообразия, популяционной структуры вида и степень интрогрессии генофонда фермерских лисиц обыкновенных в дикую популяцию в условиях Беларуси.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования и выделение ДНК. Работа выполнялась на базе Научно-практического центра Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь. Для изучения популяционной структуры рыжей (дикой) морфы и черно-бурой (фермерской) морфы лисицы обыкновенной были исследованы 412 биологических образцов мышечной и хрящевой тканей животных. Образцы от неродственных черно-бурых лисиц (всего 147 образцов, из них 77 образцов принадлежали самцам, 70 образцов – самкам) отобраны на четырех зверофермах, расположенных в Минской, Брестской, Витебской и Могилёвской областях, в то время как места изъятия образцов рыжих лисиц (всего 265 образцов, из них 165 образцов принадлежали самцам, 100 образцов – самкам) равномерно распределены по территории страны. Все образцы получены легально: образцы фермерских лисиц собраны по завершении сельскохозяйственного сезона, а образцы диких лисиц – после плановых отстрелов или гибели животных в результате дорожно-транспортных происшествий.

Выделение ДНК из биоматериала осуществляли по методике, предусматривающей инкубацию образцов в лизирующем буфере с последующей очисткой ДНК на силикагеле [10].

Конструирование тест-системы и генотипирование STR-локусов. Отобранные для исследования локусы были сгруппированы в тест-систему на основе ранее опубликованных характеристик и структур праймеров. Тест-система включала локусы, разработанные для лисицы обыкновенной (1 локус), енотовидной собаки (2 локуса) и собаки домашней (9 локусов), имеющие в своем составе различные типы тандемов: гексануклеотидные (локус vWF.X [11]), тетрануклеотидные (локусы FH2001 [12], FH2010 [13], FH2309 [14], FH2328, FH2361 [15], Pez16 [11]), тринуклеотидные (локусы Nyct10, Nyct11 [16]) и динуклеотидные (локусы CRN4 [17], FH3241 [18], V602 [19]) тандемы. Для определения половой принадлежности использовали локусы, расположенные на X- и Y-хромосомах, – DBX [20] и SRY [21] соответственно. Конечный состав реакционной смеси общим объемом 10 мкл был следующим: 10 ммоль/л трис-HCl (pH 8,6), 25 ммоль/л KCl, 2,1 ммоль/л MgCl₂, 0,2 ммоль/л каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,2–1,0 мкмоль/л каждой пары праймеров, 0,15 единицы активности ДНК-полимеразы, 1,5 нг/мкл BSA, 0,3 % Triton X-100 и 1–10 нг ДНК. Амплификацию проводили на программируемых термоциклерах C1000 (BioRad, США) по следующей схеме: 1) начальная инкубация (5 мин при 95 °C); 2) 30 циклов, состоящих из денатурации (30 с при 95 °C), отжига праймеров (40 с при 60 °C) и элонгации (1 мин при 72 °C); 3) финальная элонгация (30 мин при 72 °C).

Характерное для каждого из образцов сочетание аллелей выявляли путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в генетическом анализаторе ABI Prizm 3500 (Applied Biosystems, США). Размеры

³Наличие пушных зверей в организациях, занимающихся клеточным разведением пушных зверей, на начало года [Электронный ресурс]. URL: <http://dataportal.belstat.gov.by/Indicators/Preview?key=221065> (дата обращения: 17.03.2023).

выявленных аллелей (в парах нуклеотидов (п. н.)) в исследуемых локусах определяли с использованием внутреннего стандарта размера Orange 500 bp (*NimaGen*, Нидерланды), а также программного пакета *GeneMapper ID-X 1.6*.

Секвенирование аллелей локусов. Для выявления возможных изоаллелей и микровариантов последовательностей, а также для тандемного исчисления аллелей локусов тест-системы, принятого в судебной экспертизе, определяли их первичную структуру путем секвенирования методом Сэнгера [22]. Секвенирование проводили на приборе ABI Prizm 3500 с применением набора для секвенирования BrilliantDye™ Terminator v3.1 (*NimaGen*). Полученные результаты анализировали с помощью пакета программ *Sequencing Analysis 5.4 (Applied Biosystems)*. Сравнительный анализ последовательностей аллелей исследованных локусов ДНК выполняли с использованием ресурсов базы данных нуклеотидных последовательностей GenBank [23] и программного продукта *BioEdit 7.0.5.3* [24]. Последовательности каждого локуса сконструированной тест-системы, имеющие минимальный и максимальный молекулярный размер аллелей, внесены в базу данных GenBank с присвоением соответствующего номера доступа.

Статистический анализ результатов. Первоначальную проверку массивов генотипов лисицы обыкновенной на наличие нескольких образцов ДНК одного животного осуществляли с помощью функции *Matches* в статистическом макросе *GenAlEx 6.5* [25; 26].

Анализ на репрезентативность выборок проводили с использованием функции *H-individual (GenAlEx 6.5)*. Для установления наличия возможных ошибок в интерпретации генетических профилей у локусов со статтер-фрагментами, а также в случае выпадения аллелей, присутствия нуль-аллелей и артефактов ПЦР проводили анализ с помощью программ *Micro-Checker 2.2.1* [27] и *Cervus 3.0.7* [28].

Основной анализ генетического разнообразия, включавший в себя выявление уровня полиморфизма, расчет частот встречаемости аллелей STR-локусов, значений наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, оценку соответствия равновесию Харди – Вайнберга, проверку на наличие сцепленного наследования аллельных признаков, анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) и анализ значений *F*-статистик Райта, выполняли с использованием программных пакетов *Cervus 3.0.7* и *Arlequin 3.5.1.3* [29].

Определение популяционной структуры проводили с применением алгоритма Монте-Карло по схеме марковских цепей в программе *Structure 2.3.4* [30], используя модель *No admixture model*, с дальнейшим определением истинного количества кластеров методом Эванно [31]. Выбор стартовой точки марковской цепи осуществляли в течение 1 млн итераций, а построение марковской цепи – в течение 2,5 млн итераций для предполагаемого числа групп в выборке (*K*) от 1 до 6 в шестикратной повторности для каждой величины *K*. Для визуализации популяционной структуры проводили многомерный анализ по матрице генетических дистанций (PCoA) в статистическом макросе *GenAlEx 6.5*.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что генетические профили образцов животных из выборки дикой популяции более гетерозиготные, чем генетические профили образцов животных из выборки фермерской популяции (рис. 1).

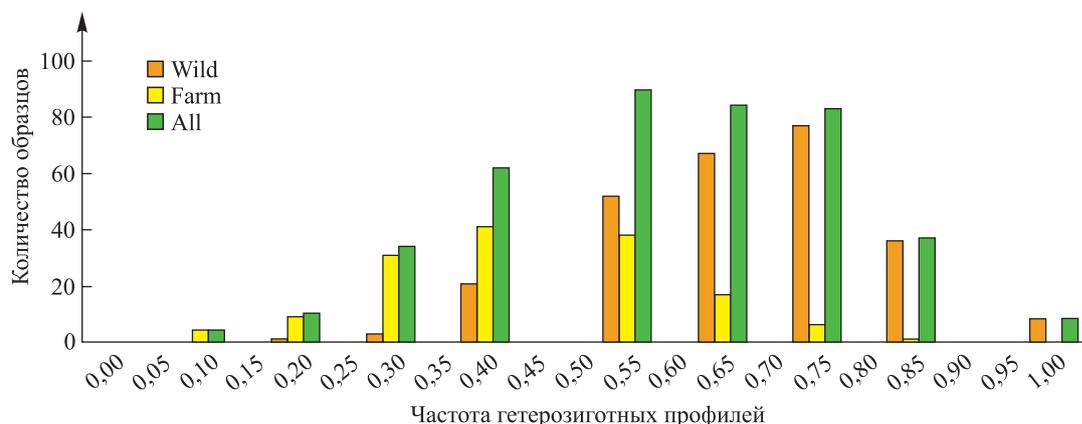


Рис. 1. Распределение частот гетерозиготных профилей в выборках дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф и объединенной выборке (All) лисицы обыкновенной, полученное с использованием сконструированной тест-системы

Fig. 1. Frequency distribution of heterozygous profiles in samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs and pooled sample (All) of the red fox, obtained using the designed test system

Медиана частот гетерозиготных профилей для дикой популяции составила 0,667 (среднее значение 0,694), для фермерской – 0,444 (среднее значение 0,469). Наблюдаемый феномен может объясняться существованием панмиксии в дикой популяции и направленной селекционной работой с фермерскими животными.

При статистическом анализе на репрезентативность выборок дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной отмечено, что распределение частот гетерозиготных профилей в исследуемых выборках, равно как и в объединенной выборке, соответствует распределению Гаусса, поскольку подчиняется правилу трех сигм. Оценка сцепленного наследования аллельных признаков локусов тест-системы, проведенная с использованием программного пакета *Arlequin 3.5.1.3*, показала отсутствие сцепленного наследования аллелей.

Таким образом, данные результаты свидетельствуют о том, что выборки животных репрезентативны, а наследование аллелей локусов тест-системы происходит независимо друг от друга.

В ходе проведенного секвенирования аллелей STR-локусов были получены нуклеотидные последовательности всех выявленных аллелей у дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной.

Установлено, что локус V602 характеризуется тандемом, состоящим из двух различных динуклеотидных повторов, – (СТ)_n(AC)₁₆, но лишь один из этих повторов – (СТ)_n – является варибельным. Неожиданный результат получен при секвенировании аллелей локуса FH2361. При переносе данного маркера на ДНК лисицы обыкновенной аллели с исходно тетра-нуклеотидным тандемом (AAAG)_n у собаки домашней визуализируются как динуклеотидные и имеют тандемное строение (AG)_n. При анализе нуклеотидной последовательности локуса половой принадлежности DBX, расположенного на X-хромосоме, у лисицы обыкновенной выявлена делеция в 2 п. н. по сравнению с гомологичной последовательностью собаки домашней, волка обыкновенного и енотовидной собаки. В нетандемной части локуса FH2001 у лисицы обыкновенной обнаружены три делетированных участка по сравнению с последовательностями локуса у вида-источника – собаки домашней (рис. 2).

Identity	1	10	20	30	34	37	40	50	60	70	80									
V.v. 7a	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	T---	AAC	TTTT	ATCT	----	----						
V.v. 8del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
V.v. 10del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
V.v. 11del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
V.v. 12del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
V.v. 13del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
V.v. 14del	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								
C.l.f.	CCTC	CTCT	TCTT	TCCA	TTGG	TCTG	TAAT	TACT	TAAA	GAAC	TTTT	ATCT								

Identity	90	101	106	110	120	130	133	140	150	157									
V.v. 7a	----	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 8del	----	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 10del	ATCT	----	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 11del	ATCT	ATCT	----	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 12del	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 13del	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
V.v. 14del	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	----	----	CGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A					
C.l.f.	ATCT	ATCT	ATCT	ATCT	CAAT	CTAT	TGTA	TCTA	TCTA	TCTA	CCTA	TCTA	TCGT	GTCT	ATCC	TTAA	CTCT	GTTC	A

Рис. 2. Участок последовательности локуса FH2001 у лисицы обыкновенной (V.v. 7a; V.v. 8del; V.v. 10del; V.v. 11del; V.v. 12del; V.v. 13del; V.v. 14del) и собаки домашней (C.l.f.)

Fig. 2. Sequence of the FH2001 locus of the red fox (V.v. 7a; V.v. 8del; V.v. 10del; V.v. 11del; V.v. 12del; V.v. 13del; V.v. 14del) and the dog (C.l.f.)

Две делеции (см. рис. 2, позиции 101–106 и 130–133) обнаружены во всех идентифицированных аллелях как в выборке дикой популяции, так и в выборке фермерской популяции лисицы обыкновенной. Одна делеция (см. рис. 2, позиция 34–37) выявлена лишь у аллеля с числом тандемных повторов, равным семи. Особо следует отметить, что в пуле всех секвенированных аллелей локуса FH2001 на ДНК лисицы обыкновенной аллель с семью тандемными повторами, но без выявленной делеции не обнаружен, равно как и любые другие аллели без делетированных участков в позициях 101–106 и 130–133. Последнее обстоятельство дает основание полагать, что в локусе FH2001 не будет выявлено размерной гомоплазии и микровариантов последовательностей при проведении идентификационных исследований.

Полученные нуклеотидные последовательности аллелей депонированы в базу данных GenBank (табл. 1), а также идентифицированы в тандемном исчислении в целях унификации панели локусов к различному приборному оборудованию.

Таблица 1

**Структура тандемов микросателлитных локусов
тест-системы и номера доступа
к последовательностям аллелей в базе данных GenBank**

Table 1

**The structure of tandems of microsatellite loci
of the test system and access numbers
to allele sequences in the GenBank database**

Локус	Структура тандема	Номер доступа в базе данных GenBank
CPH4	(CA) ₃	OQ7077940
FH2001	(GATA) _n	OQ7077945, OQ7077947, OQ7077946
FH2010	(AATG) _n	OQ7077950, OQ7077951
FH2309	(GAAA) _n	OQ7077943, OQ7077944
FH2328	(GAAA) _n	OQ7077954, OQ7077955
FH2361	(AG) _n	OQ7077952, OQ7077953
FH3241	(TG) _n	OQ7077958, OQ7077959
Nyct10	(GCT) ₆	OQ7077939
Nyct11	(TGC) _n	OQ7077948, OQ7077949
Pez16	(GAAA) _n	OQ7077956, OQ7077957
V602	(CT) _n (AC) ₁₆	OQ7077941, OQ7077942
vWF.X	(AGGAAT) ₂	OQ7077938
DBX	–	OQ7077960
SRY	–	OQ7077961

Выявленное распределение аллелей указало на возможное наличие нуль-аллелей в 2 локусах – FH2309 (в выборке дикой популяции) и FH2001 (в обеих выборках). Согласно результатам исследования нуль-аллелей STR-локусов и их влияния на оценку популяционной дифференциации нуль-аллели с частотами встречаемости от 5 до 8 % оказывают незначительное влияние на классические оценки популяционной дифференциации, но нуль-аллели с более высокими частотами встречаемости будут смещать данные параметры [32]. Частота встречаемости возможных нуль-аллелей в локусе FH2309 в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной составила 6,23 %, в связи с чем результаты его генотипирования принимались во внимание при дальнейшем анализе.

Локус FH2001 характеризовался достаточно высокой частотой вероятных нуль-аллелей: 15,04 % для выборки фермерской популяции и 23,33 % для выборки дикой популяции. Одной из причин наблюдаемого феномена могла быть ошибка в дизайне праймеров в случае, когда нуклеотидная последовательность лисицы обыкновенной отличается от консервативной эталонной последовательности, на основе которой разработаны данные праймеры [33]. Однако использование праймеров нового дизайна, место посадки которых было смещено как в направлении от 5'-конца, так и в направлении от 3'-конца, привело к воспроизведению генотипов всех образцов ДНК гомозиготного профиля в этом локусе в обеих выборках животных, что указывает на отсутствие нуль-аллелей.

Суммарно в объединенной выборке лисицы обыкновенной с применением предложенной тест-системы идентифицированы 103 аллеля (100 аллелей выявлены в выборке дикой популяции и 57 аллелей – в выборке фермерской популяции) (табл. 2).

Установлено, что 3 локуса (vWF.X, Nyct10 и CPH4) у лисицы обыкновенной являются мономорфными с молекулярными размерами аллелей, отличными от таковых у других видов псовых, что дает возможность использовать их в качестве внутреннего контроля видовой принадлежности исследуемых образцов или при дифференциации представителей семейства псовых. Остальные локусы были полиморфными и имели от 3 (локусы FH2309 и Nyct11 в выборке фермерской популяции) и 5 (локус FH2010 в выборке дикой популяции) до 10 (локус V602 в выборке фермерской популяции) и 16 (локус Pez16 в выборке дикой популяции) аллелей на локус. Среднее количество аллелей на локус в выборке дикой популяции составило 11,11, а в выборке фермерской популяции – 6,33 (рис. 3).

Таблица 2

Количество выявленных аллелей в исследованных выборках
 и показатели информативной ценности локусов тест-системы

Table 2

The number of identified alleles in the samples
 and polymorphism information content of the loci of the test system

Локус	Выборка дикой морфы лисицы обыкновенной		Выборка фермерской морфы лисицы обыкновенной	
	N_A	PIС	N_A	PIС
FH2001	13	0,848	5	0,408
FH2010	5	0,563	6	0,456
FH2309	7	0,669	3	0,394
FH2328	11	0,833	8	0,722
FH2361	12	0,757	6	0,190
FH3241	15	0,830	8	0,400
Nyct11	7	0,352	3	0,150
Pez16	16	0,894	8	0,633
V602	14	0,864	10	0,622
Среднее значение	11,11	0,734	6,33	0,442

Пр и м е ч а н и е. Используемые обозначения: N_A – количество выявленных аллелей в локусе; PIС – показатель информативной ценности локуса.

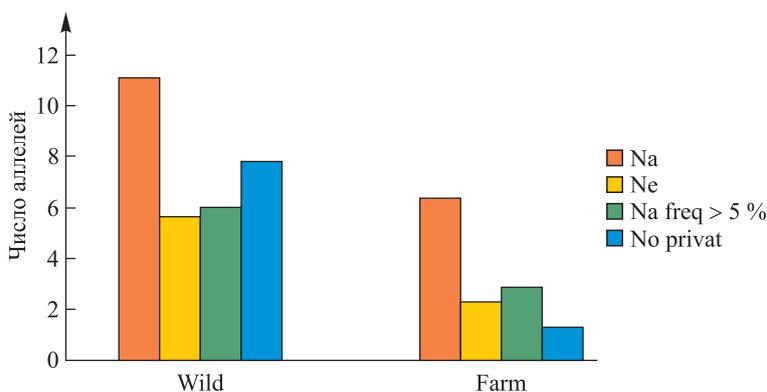


Рис. 3. Характеристика полиморфизма локусов тест-системы в выборках дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф лисицы обыкновенной (N_A – среднее число выявленных аллелей; N_e – среднее число эффективных аллелей на локус; $N_A \text{ freq} > 5\%$ – среднее число аллелей с частотой встречаемости более 5%; No privat – число уникальных для выборки аллелей)

Fig. 3. Characterisation of the polymorphism of the test system loci in samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox (N_A – average number of identified alleles; N_e – average number of effective alleles per locus; $N_A \text{ freq} > 5\%$ – average number of alleles with a frequency of occurrence of more than 5%; No privat – the number of alleles unique for the sample)

Более низкое аллельное разнообразие в выборке фермерской морфы может указывать на наличие инбридинга вследствие искусственного отбора и генетического дрейфа, который в ряде случаев приводит к существенному снижению разнообразия [34]. Мутационный процесс противодействует дрейфу, но ввиду жесткой направленности отбора при разведении пушных животных с определенными фенотипическими характеристиками сложно добиться равновесия генетических процессов вследствие элиминации из разведения особей с выявленными мутациями в том или ином признаке. Оптимальные параметры генетического разнообразия аллельных профилей отмечены в выборке дикой морфы, что свидетельствует о естественном развитии и наличии мутационно-дрейфового равновесия в природной популяции.

Согласно работе [35] показатель PIC для высокоинформативного локуса должен превышать 0,5, для достаточно информативного локуса он может быть менее 0,5, но обязательно более 0,25. Для наименее информативного локуса (Nuct11) в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной показатель PIC был равен 0,352 (см. табл. 2). Минимальное значение показателя PIC для выборки фермерской популяции выявлено у локуса Nuct11 (0,150). Такое значение обусловлено существованием сильно выраженного мажорного аллеля. Максимальное значение показателя PIC отмечено у локуса Pez16 (0,894) для дикой морфы и у локуса FH2328 (0,722) для фермерской морфы, что объясняется большим количеством выявленных аллелей с относительно равномерным распределением в выборках. Среднее значение показателя PIC для выборок дикой и фермерской морф составило 0,734 и 0,442 соответственно. Таким образом, полученные данные следует считать значимыми для интерпретации результатов и оценки уровня изменчивости.

Для 2 из 9 исследованных полиморфных локусов (FH2309 и FH2010) аллельное распределение в выборке дикой популяции лисицы обыкновенной не соответствовало распределению Харди – Вайнберга ($p < 0,05$). После введения поправки Бонферрони значения p становятся статистически незначимыми только для локуса FH2010 (табл. 3). Локус FH2309 демонстрирует устойчивое отклонение от равновесия Харди – Вайнберга в обеих выборках лисицы обыкновенной.

Таблица 3

Значения показателей гетерозиготности и индексов фиксации локусов тест-системы в выборках дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной

Table 3

Values of heterozygosity and fixation indices of test system loci in samples of wild and farm morphs of the red fox

Локус	Выборка дикой морфы лисицы обыкновенной			Выборка фермерской морфы лисицы обыкновенной			F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
	H_O	H_E	p	H_O	H_E	p			
FH2001	0,635	0,765	0,909	0,388	0,522	0,387	0,333	0,404	0,107
FH2010	0,611	0,633	0,007	0,469	0,486	0,875	0,032	0,129	0,101
FH2309	0,608	0,700	0,001	0,510	0,514	0,001	0,077	0,157	0,087
FH2328	0,823	0,851	0,816	0,762	0,760	0,992	0,014	0,083	0,071
FH2361	0,747	0,789	0,671	0,163	0,197	0,380	0,074	0,369	0,318
FH3241	0,849	0,850	0,047	0,401	0,414	0,881	0,009	0,223	0,216
Nuct11	0,351	0,369	0,398	0,163	0,162	0,398	0,029	0,566	0,553
Pez16	0,876	0,904	0,815	0,667	0,686	0,831	0,028	0,104	0,078
V602	0,849	0,877	0,622	0,701	0,661	0,614	-0,010	0,080	0,089
Среднее значение	0,705	0,749	–	0,469	0,489	–	0,065	0,235	0,180

Примечание. Используемые обозначения: H_O – значения наблюдаемой гетерозиготности; H_E – значения ожидаемой гетерозиготности; p – уровень статистической значимости соответствия равновесию Харди – Вайнберга; F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации; F_{ST} – субпопуляционный индекс фиксации ($p = 0,000$); F_{IT} – популяционный индекс фиксации.

Индекс F_{IS} для большинства исследованных локусов имел значения, достаточно близкие к нулю, что в совокупности с высокими значениями гетерозиготности может указывать на наличие в популяции панмиксии [34]. Когда популяция испытывает сокращение своего эффективного размера, она обычно развивает избыток гетерозиготности в селективно нейтральных локусах [36]. В выборке дикой популяции лисицы обыкновенной избытка гетерозигот не выявлено, что говорит об отсутствии сокращения эффективной численности, несмотря на высокий уровень элиминации особей в ходе охоты.

Значения индекса F_{IT} у большинства локусов существенно превышают значения индекса F_{IS} . Эти результаты могут свидетельствовать о том, что «управляемая» схема разведения особей в выборке фермерской популяции лисицы обыкновенной является дополнительным фактором, определяющим уровень гетерозиготности объединенной выборки [37, с. 88].

Согласно С. Райту [38, р. 82] значения $F_{ST} \geq 0,25$ указывают на сильную дифференциацию выборок, а значения $0,15 < F_{ST} < 0,25$ – на умеренную дифференциацию. Для локусов FH2001, FH2361 и Nuct11 отмечена значительная дифференцирующая способность дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Высокий показатель дифференциации локуса Nuct11 ($F_{ST} = 0,566$) объясняется различными у обеих выборок мажорными аллелями, при этом преобладающий в выборке фермерской популяции аллель (аллель 7) полностью отсутствует в выборке дикой популяции. Локус FH2361 характеризуется

преобладанием одного аллеля (аллель 11) в выборке фермерской популяции, в то время как в выборке дикой популяции выявлено равномерное распределение аллельных признаков обоих локусов (FH2361 и Nuct11). В локусе FH2001 наблюдается схожая ситуация: равномерное распределение аллельных признаков в выборке дикой популяции и наличие двух мажорных аллелей в выборке фермерской популяции, совокупная частота которых превышает 0,970.

В силу того что у гипервариабельных маркеров с большим количеством аллелей значения индекса F_{ST} могут быть существенно ниже, чем у маркеров с малым количеством аллелей, более важным является обнаружение значимой генетической дифференциации дикой и фермерской морф по совокупности отобранных STR-локусов [39, р. 388]. Результаты анализа AMOVA показали, что процент вариаций между выборками дикой и фермерской популяций составил 27,44 %, а внутри выборок – 72,56 % (табл. 4).

Таблица 4

Результаты анализа AMOVA выборок дикой и фермерской морф лисицы обыкновенной с использованием сконструированной тест-системы

Table 4

AMOVA results of samples of wild and farm morphs of the red fox using the designed test system

Показатели	Вариации между выборками	Вариации внутри выборок	Всего
Число степеней свободы	1	822	823
Сумма квадратов	430,109	2452,827	2882,936
Компоненты дисперсии	1,128 76	2,984 52	4,113 28
Процент вариаций	27,44	72,56	–
F_{IS}	0,074 10		–
F_{ST}	0,274 42		–
F_{IT}	0,328 19		–

Компоненты дисперсии между выборками были значимыми для всех используемых локусов, демонстрируя наличие существенной дифференциации дикой и фермерской популяций лисицы обыкновенной. Локусы FH2361, FH3241 и Nuct11 внесли 44,16; 33,21 и 68,88 % изменчивости между изучаемыми выборками соответственно, а локусы FH2328 и Pez16 показали самую низкую вариабельность между дикими и фермерскими лисицами (12,77 и 13,79 % соответственно).

Кластерный анализ, выполненный в программе *Structure*, выявил для совокупного массива генотипов лисицы обыкновенной модальное значение ΔK при $K = 2$, что свидетельствует о существовании двух генетических кластеров в объединенной выборке (рис. 4). При $K = 2$ выборка дикой популяции формирует один кластер, а выборка фермерской популяции – другой кластер. Анализ популяционной структуры выявил достаточно высокие показатели генетической дифференциации исследуемых выборок. Среднее значение коэффициента принадлежности к собственному кластеру составило 0,991 и 0,986 для выборок дикой и фермерской популяций соответственно.

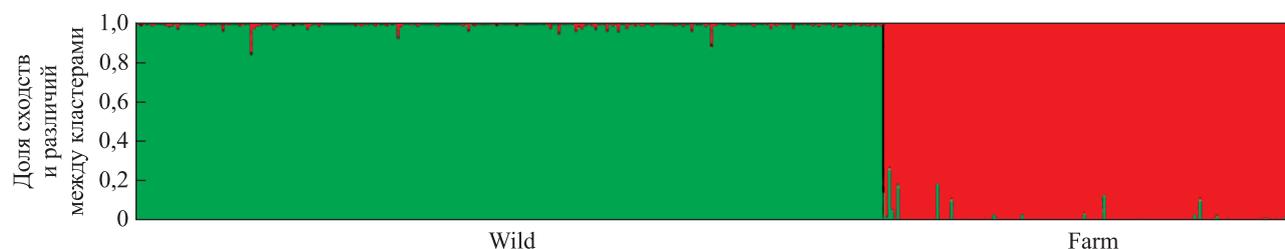


Рис. 4. Результаты кластерного анализа выборок дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф лисицы обыкновенной, выполненного в программе *Structure* для наиболее вероятного значения числа исходных генетических кластеров ($K = 2$) (результаты отсортированы по выборкам)

Fig. 4. Results of cluster analysis of samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox, performed in the *Structure* programme for the most probable value of the number of clusters ($K = 2$) (results sorted by samples)

Результаты кластерного анализа согласуются с результатами анализа PCoA, который также показывает четкую дифференциацию выборок дикой и фермерской популяций (рис. 5). С использованием предложенных локусов, как и в случае с кластерным анализом в программе *Structure*, отмечаются генетическая гомогенность и высокая консолидированность обеих выборок, что указывает на истинную дифференциацию дикой популяции лисицы обыкновенной и содержащихся на зверофермах животных этого вида.

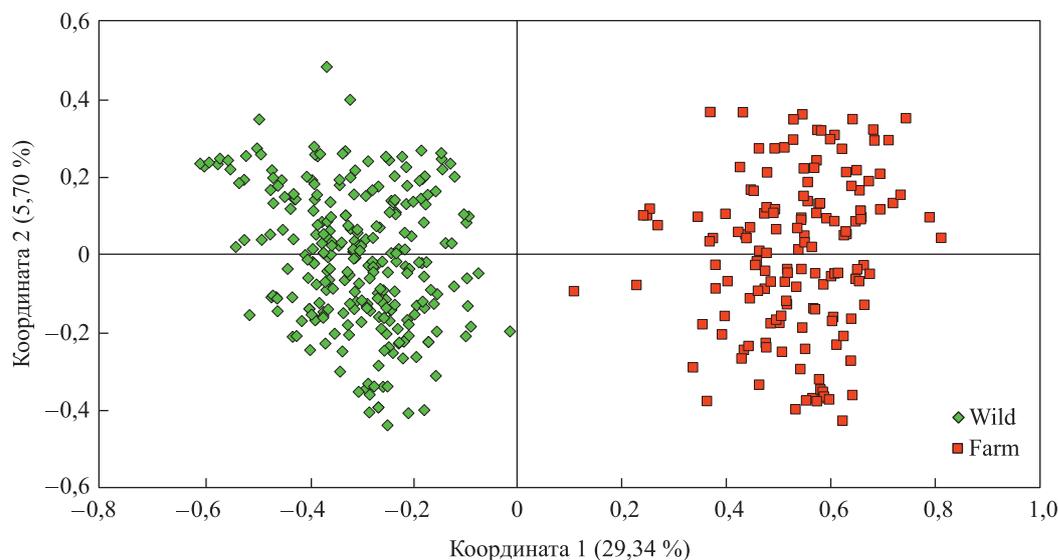


Рис. 5. Диаграмма результатов анализа PCoA на основе матрицы F_{ST} для выборок дикой (Wild) и фермерской (Farm) морф лисицы обыкновенной

Fig. 5. Diagram of the results of PCoA analysis based on the F_{ST} matrix for samples of wild (Wild) and farm (Farm) morphs of the red fox

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии генетической интрогрессии между фермерской и дикой популяциями лисицы обыкновенной в Беларуси.

Заклучение

В ходе проведенных экспериментов отобраны 12 STR-локусов и 2 локуса половой принадлежности, которые обладают приемлемыми характеристиками в исследовании ДНК особей лисицы обыкновенной, содержащихся на зверофермах и обитающих в природной популяции. Проведена оценка полиморфизма локусов, а также подтверждены тандемная структура аллелей локусов и отсутствие нуль-аллелей при генотипировании. Отмечено мономорфное проявление 3 локусов с размерами аллелей, отличными от таковых у других видов семейства псовых, что позволяет использовать эти локусы в качестве внутреннего контроля видовой принадлежности исследуемых образцов.

Согласно результатам генетико-статистического анализа массива генотипов образцов лисицы обыкновенной все локусы наследуются независимо и, за исключением 1 локуса, соответствуют равновесию Харди – Вайнберга. Показано, что выборка дикой популяции лисицы обыкновенной представляет собой единый генетический кластер без примеси генов фермерских животных. Это свидетельствует об отсутствии генетической интрогрессии между фермерской и дикой популяциями лисицы обыкновенной в стране.

На основе проведенного исследования разработаны методические материалы по ДНК-идентификации лисицы обыкновенной [40], которые успешно применяются в экспертной практике при расследовании фактов незаконной охоты, нападения животных и других правонарушений в Республике Беларусь.

Библиографические ссылки

1. Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW. *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs*. Gland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; 2004. 430 p.
2. Horecka B. Genetic diversity of ranch and feral American mink (*Neovison vison* Schreber, 1777) in Poland in relation to the natural population of the species. *Belgian Journal of Zoology*. 2019;149:49–61. DOI: 10.26496/bjz.2019.30.

3. Cabria MT, Michaux JR, Gomez-Moliner BJ, Skumatov D, Maran T, Fournier P, et al. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology*. 2011;20(6):1176–1190. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04988.x.
4. Feulner PGD, Gratten J, Kijas JW, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. Introgression and the fate of domesticated genes in a wild mammal population. *Molecular Ecology*. 2013;22(16):4210–4221. DOI: 10.1111/mec.12378.
5. Wierzbicki H, Zaton-Dobrowolska M, Mucha A, Moska M. Insight into the genetic population structure of wild red foxes in Poland reveals low risk of genetic introgression from escaped farm red foxes. *Genes*. 2021;12(5):637. DOI: 10.3390/genes12050637.
6. Akins JR, Aubry KB, Sacks BN. Genetic integrity, diversity, and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*. 2018;19(4):969–980. DOI: 10.1007/s10592-018-1070-y.
7. Cross PR, Sacks BN, Luikart G, Schwartz MK, Van Etten KW, Crabtree RL. Red fox ancestry and connectivity assessments reveal minimal fur farm introgression in Greater Yellowstone ecosystem. *Journal of Fish and Wildlife Management*. 2018;9(2):519–530. DOI: 10.3996/092017-JFWM-073.
8. Lounsberry ZT, Quinn CB, Statham MJ, Angulo CL, Kalani TJ, Tiller E, et al. Investigating genetic introgression from farmed red foxes into the wild population in Newfoundland, Canada. *Conservation Genetics*. 2017;18(2):383–392. DOI: 10.1007/s10592-016-0914-6.
9. Horecka B, Kasperek K, Jezewska-Witkowska G, Slaska B, Rozempolska-Rucinska I, Gryzinska M, et al. High genetic distinctiveness of wild and farm fox (*Vulpes vulpes* L.) populations in Poland: evidence from mitochondrial DNA analysis. *Turkish Journal of Zoology*. 2017;41(5):783–790. DOI: 10.3906/zoo-1611-16.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
11. DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2004;35(1):14–17. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x.
12. Verardi A, Lucchini V, Verardi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis: hybridization in Italian wolves and dogs. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):2845–2855. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x.
13. Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 2004;118(6):337–342. DOI: 10.1007/s00414-004-0479-7.
14. Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R. Wolf – dog crossbreeding: «smelling» a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology*. 2014;79(2):149–156. DOI: 10.1016/j.mambio.2013.07.080.
15. Dayton M, Koskinen MT, Tom BK, Mattila A-M, Johnston E, Halverson J, et al. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croatian Medical Journal*. 2009;50(3):268–285. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.268.
16. Hong Y, Kim KS, Lee H, Min M-S. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers. *Genes and Genetic Systems*. 2013;88(1):69–76. DOI: 10.1266/ggs.88.69.
17. Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics*. 2010;4(5):334–338. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.012.
18. Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, et al. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf – dog hybrids. *Heredity*. 2003;90(1):17–24. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800175.
19. Whiteside HM, Dawson DA, Soulsbury CD, Harris S. Mother knows best: dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22145. DOI: 10.1371/journal.pone.0022145.
20. Seddon JM. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):147–149. DOI: 10.1007/s10592-004-7734-9.
21. DeCandia A, Gaughran S, Caragiulo A, Amato G. A novel molecular method for noninvasive sex identification of order Carnivora. *Conservation Genetics Resources*. 2016;8(2):119–121. DOI: 10.1007/s12686-016-0525-z.
22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
23. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(supplement 1):D16–D20. DOI: 10.1093/nar/gkj157.
24. Alzohairy AM. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011;2(1):60–61.
25. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
26. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
27. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
28. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007;16(5):1099–1106. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x.
29. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47–50.
30. Pritchard JK, 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.
31. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
32. Chapuis M-P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(3):621–631. DOI: 10.1093/molbev/msl191.
33. Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(4):999–1005. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.

34. Галинская ТВ, Щепетов ДМ, Лысенков СН. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять. *Генетика*. 2019;55(6):617–632. DOI: 10.1134/S0016675819060043.
35. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331. PMID: 6247908.
36. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001–2014. DOI: 10.1093/genetics/144.4.2001.
37. Кузнецов ВМ. F-статистики Райта: оценка и интерпретация. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2014;4:80–104.
38. Wright S. *Variability within and among natural populations*. Chicago: University Chicago Press; 1978. 590 p. (Evolution and the genetics of populations; volume 4).
39. Hedrick PW. *Genetics of populations*. 4th edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2011. 675 p.
40. Гребенчук АЕ, Лукашкова ОН, Парфенова АС, Котова СА, Цыбовский ИС. *Методика ДНК-идентификации биологических образцов животных вида лисица обыкновенная (Vulpes vulpes)*. Минск: БелНИИТ «Транстехника»; 2022. 49 с.

References

1. Sillero-Zubiri C, Hoffman M, Macdonald DW. *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs*. Gland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; 2004. 430 p.
2. Horecka B. Genetic diversity of ranch and feral American mink (*Neovison vison* Schreber, 1777) in Poland in relation to the natural population of the species. *Belgian Journal of Zoology*. 2019;149:49–61. DOI: 10.26496/bjz.2019.30.
3. Cabria MT, Michaux JR, Gomez-Moliner BJ, Skumatov D, Maran T, Fournier P, et al. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered European mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology*. 2011;20(6):1176–1190. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04988.x.
4. Feulner PGD, Gratten J, Kijas JW, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. Introgression and the fate of domesticated genes in a wild mammal population. *Molecular Ecology*. 2013;22(16):4210–4221. DOI: 10.1111/mec.12378.
5. Wierzbicki H, Zaton-Dobrowolska M, Mucha A, Moska M. Insight into the genetic population structure of wild red foxes in Poland reveals low risk of genetic introgression from escaped farm red foxes. *Genes*. 2021;12(5):637. DOI: 10.3390/genes12050637.
6. Akins JR, Aubry KB, Sacks BN. Genetic integrity, diversity, and population structure of the Cascade red fox. *Conservation Genetics*. 2018;19(4):969–980. DOI: 10.1007/s10592-018-1070-y.
7. Cross PR, Sacks BN, Luikart G, Schwartz MK, Van Etten KW, Crabtree RL. Red fox ancestry and connectivity assessments reveal minimal fur farm introgression in Greater Yellowstone ecosystem. *Journal of Fish and Wildlife Management*. 2018;9(2):519–530. DOI: 10.3996/092017-JFWM-073.
8. Lounsbury ZT, Quinn CB, Statham MJ, Angulo CL, Kalani TJ, Tiller E, et al. Investigating genetic introgression from farmed red foxes into the wild population in Newfoundland, Canada. *Conservation Genetics*. 2017;18(2):383–392. DOI: 10.1007/s10592-016-0914-6.
9. Horecka B, Kasperek K, Jezewska-Witkowska G, Slaska B, Rozempolska-Rucinska I, Gryzinska M, et al. High genetic distinctiveness of wild and farm fox (*Vulpes vulpes* L.) populations in Poland: evidence from mitochondrial DNA analysis. *Turkish Journal of Zoology*. 2017;41(5):783–790. DOI: 10.3906/zoo-1611-16.
10. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(3):495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990.
11. DeNise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, McKenna S, et al. Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 2004;35(1):14–17. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01074.x.
12. Verardi A, Lucchini V, Verardi E. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis: hybridization in Italian wolves and dogs. *Molecular Ecology*. 2006;15(10):2845–2855. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02995.x.
13. Eichmann C, Berger B, Reinhold M, Lutz M, Parson W. Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. *International Journal of Legal Medicine*. 2004;118(6):337–342. DOI: 10.1007/s00414-004-0479-7.
14. Lorenzini R, Fanelli R, Grifoni G, Scholl F, Fico R. Wolf – dog crossbreeding: «smelling» a hybrid may not be easy. *Mammalian Biology*. 2014;79(2):149–156. DOI: 10.1016/j.mambio.2013.07.080.
15. Dayton M, Koskinen MT, Tom BK, Mattila A-M, Johnston E, Halverson J, et al. Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. *Croatian Medical Journal*. 2009;50(3):268–285. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.268.
16. Hong Y, Kim KS, Lee H, Min M-S. Population genetic study of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in South Korea using newly developed 12 microsatellite markers. *Genes and Genetic Systems*. 2013;88(1):69–76. DOI: 10.1266/ggs.88.69.
17. Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics*. 2010;4(5):334–338. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.012.
18. Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, Andersone Z, Casulli A, et al. Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf – dog hybrids. *Heredity*. 2003;90(1):17–24. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800175.
19. Whiteside HM, Dawson DA, Soulsbury CD, Harris S. Mother knows best: dominant females determine offspring dispersal in red foxes (*Vulpes vulpes*). *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22145. DOI: 10.1371/journal.pone.0022145.
20. Seddon JM. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*. 2005;6(1):147–149. DOI: 10.1007/s10592-004-7734-9.
21. DeCandia A, Gaughran S, Caragiulo A, Amato G. A novel molecular method for noninvasive sex identification of order Carnivora. *Conservation Genetics Resources*. 2016;8(2):119–121. DOI: 10.1007/s12686-016-0525-z.
22. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
23. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(supplement 1):D16–D20. DOI: 10.1093/nar/gkj157.

24. Alzohairy AM. BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. 2011;2(1):60–61.
25. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006;6(1):288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
26. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
27. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
28. Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 2007;16(5):1099–1106. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2007.03089.x.
29. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47–50.
30. Pritchard JK, 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.
31. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
32. Chapuis M-P, Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24(3):621–631. DOI: 10.1093/molbev/msl191.
33. Kwok S, Kellogg DE, McKimney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*. 1990;18(4):999–1005. DOI: 10.1093/nar/18.4.999.
34. Galinskaya TV, Schepetov DM, Lysenkov SN. Prejudices against microsatellite studies and how to resist them. *Genetika*. 2019;55(6):617–632. Russian. DOI: 10.1134/S0016675819060043.
35. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 1980;32(3):314–331. PMID: 6247908.
36. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001–2014. DOI: 10.1093/genetics/144.4.2001.
37. Kuznetsov VM. Wright's *F*-statistics: estimation and interpretation. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh*. 2014;4:80–104. Russian.
38. Wright S. *Variability within and among natural populations*. Chicago: University Chicago Press; 1978. 590 p. (Evolution and the genetics of populations; volume 4).
39. Hedrick PW. *Genetics of populations*. 4th edition. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2011. 675 p.
40. Hrebianchuk AE, Lukashkova VM, Parfionava NS, Kotova SA, Tsybovsky IS. *Metodika DNK-identifikatsii biologicheskikh obraztsov zhivotnykh vida litsa obyknovennaya (Vulpes vulpes)* [Methodology for DNA identification of biological samples of animals of the red fox species (*Vulpes vulpes*)]. Minsk: BelNIIT «Transtekhnika»; 2022. 49 p. Russian.

Получена 25.07.2023 / исправлена 25.09.2023 / принята 28.09.2023.
Received 25.07.2023 / revised 25.09.2023 / accepted 28.09.2023.

Авторы:

Александра Евгеньевна Гребенчук – государственный судебный эксперт отдела исследования и учета объектов животного происхождения и волокистой природы управления генотипоскопического учета главного управления специальных экспертиз центрального аппарата.

Анастасия Сергеевна Парфенова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Ольга Николаевна Лукашкова – государственный судебный эксперт отдела судебно-биологических и судебно-генетических экспертиз управления лабораторных исследований вещественных доказательств биологического характера управления Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь по Минской области.

Иосиф Станиславович Цыбовский – кандидат биологических наук; ведущий специалист сектора учебно-методической работы управления кадровой и учебно-методической работы.

Authors:

Aliaksandra E. Hrebianchuk, state forensic expert at the department of research and accounting of objects of animal origin and fibrous nature, directorate of genotyposcopic examination, general directorate of special examination, central office.

iamsanya94@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Nastassia S. Parfionava, junior researcher at the laboratory of molecular biology research.

anastaciaparfenova@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3573-3039>

Volha M. Lukashkova, state forensic expert at the department of forensic biological and forensic genetic examinations, directorate of laboratory research of material evidence of a biological nature, Minsk Region directorate of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus.

122805@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-6628-1349>

Iosif S. Tsybovsky, PhD (biology); leading specialist at the sector of educational and methodical work, directorate of human resources and educational and methodical work.

tsybovsky@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0002-8611-8215>