

## Проблемы таксономической идентификации уникальных объектов животного происхождения по маркерам митохондриальной ДНК для целей судебной экспертизы

 Л.С. Зиневич<sup>1,2</sup>,  А.А. Рыбакова<sup>2</sup>,  А.М. Орлов<sup>1,3</sup>,  Н.Б. Коростелев<sup>1</sup>, Г.Ф. Рашидова<sup>2</sup>,  И.В. Стороженко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва 119071, Россия

<sup>2</sup>Федеральное бюджетное учреждение Российский федеральный центр имени профессора А.Р. Шляхова при Минюсте России, Москва 101000, Россия

<sup>3</sup>ФГБУН Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва 117997, Россия

**Аннотация.** Прямая идентификация в судебной молекулярно-генетической экспертизе представляет собой непосредственное сравнение идентифицирующих характеристик, таких как профили ДНК объекта идентификации, с идентифицирующими характеристиками объектов сравнения, в том числе полученными из базы данных. При этом идентификация объектов животного происхождения осуществляется в результате сравнения нуклеотидной последовательности целевого участка ДНК, полученной в процессе секвенирования, с различными нуклеотидными последовательностями ДНК, которые хранятся в международных базах данных. Целью данной работы было установление видовой принадлежности образца животного происхождения – ласкомства для домашних животных «Сублимированная акула». Несмотря на то, что это исследование проводилось вне рамок судебной молекулярно-генетической экспертизы, его результаты представляют собой иллюстрацию возможных методических проблем, связанных с установлением таксономической принадлежности редко встречающихся объектов животного происхождения молекулярно-генетическими методами. Авторами статьи показано, что исследование неизвестных объектов животного происхождения методами ДНК-анализа при проведении судебной экспертизы в некоторых случаях будет требовать разработки и применения уникальных частных экспертных методик, а также продемонстрирована целесообразность создания в России единой национальной базы генетической информации с особыми требованиями контроля.

**Ключевые слова:** судебная экспертиза, молекулярно-генетическая экспертиза, митохондриальная ДНК, база данных, ДНК-штрихкод, редкие виды, животные

**Для цитирования:** Зиневич Л.С., Рыбакова А.А., Орлов А.М., Коростелев Н.Б., Рашидова Г.Ф., Стороженко И.В. Проблемы таксономической идентификации уникальных объектов животного происхождения по маркерам митохондриальной ДНК для целей судебной экспертизы // Теория и практика судебной экспертизы. 2025. Т. 20. № 4. С. 88–98.  
<https://doi.org/10.30764/1819-2785-2025-4-88-98>

## Problems of Taxonomic Identification of Unique Objects of Animal Origin by Mitochondrial DNA Markers for the Purposes of Forensic Examination

 Liudmila S. Zinevich<sup>1,2</sup>,  Anna A. Rybakova<sup>2</sup>,  Alexei M. Orlov<sup>1,3</sup>,  Nikolai B. Korostelev<sup>1</sup>,  Guzel' F. Rashidova<sup>2</sup>,  Irina V. Storozhenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow 119071, Russia

<sup>2</sup>The Russian Federal Centre of Forensic Science named after professor A.R. Shlyakhov of the Ministry of Justice of the Russian Federation, Moscow 101000, Russia

<sup>3</sup>Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia

**Abstract.** Direct identification in forensic molecular genetic examination is a direct comparison of identifying characteristics, such as DNA profiles of the identification object, with identifying characteristics of the objects of comparison, including those obtained from the database. At the same time, the identification of objects of animal origin is carried out by comparing the sequencing

results: base sequences of the target DNA fragment with various DNA nucleotide sequences stored in international databases. The purpose of this work was to establish the species identity of a sample of animal origin – the “Freeze-dried Shark” pet food. Despite the fact that this study was conducted outside the framework of forensic molecular genetic examination, its results illustrate possible methodological problems associated with establishing the taxonomic affiliation of rare objects of animal origin by molecular genetic methods. The authors of the article show that the study of unknown objects of animal origin using DNA analysis under forensic examination will require the development and application of unique private expert techniques in some cases. They also demonstrate the feasibility of creating a unified national database of genetic information in Russia with special control requirements.

**Keywords:** *forensic examination, forensic molecular genetic examination, mitochondrial DNA, database, DNA barcode, rare species, animals*

**For citation:** Zinevich L.S., Ribakova A.A., Orlov A.M., Korostelev N.B., Rashidova G.F., Storozhenko I.V. Problems of Taxonomic Identification of Unique Objects of Animal Origin by Mitochondrial DNA Markers for the Purposes of Forensic Examination. *Theory and Practice of Forensic Science*. 2025. Vol. 20. No. 4. P. 88–98. (In Russ.). <https://doi.org/10.30764/1819-2785-2025-4-88-98>

### Введение

Прямая идентификация в судебной молекулярно-генетической экспертизе состоит в непосредственном сравнении идентифицирующих характеристик, таких как профили ДНК объекта идентификации, с идентифицирующими характеристиками объектов сравнения, в том числе полученными из базы данных. Фрагменты митохондриальных генов цитохромоксидазы I (COI) и цитохрома b (CYTB) широко используются в проектах, связанных с ДНК-штрихкодированием животных, то есть определением их видовой и даже внутривидовой принадлежности [1]. При этом идентификация объектов животного происхождения осуществляется путем сравнения нуклеотидной последовательности целевого участка ДНК, полученной в процессе секвенирования, с различными нуклеотидными последовательностями ДНК, которые хранятся в международных базах данных. Последовательность ДНК известного биологического вида, совпадающая с анализируемой, свидетельствует о принадлежности объекта тому же биологическому виду [2, 3].

Полиморфные участки митохондриальной ДНК (мтДНК) представляют интерес для криминалистического исследования в первую очередь из-за высокого уровня полиморфизма. Высокий уровень изменчивости мтДНК обеспечивает широкий спектр индивидуализирующих характеристик и, следовательно, высокий дискриминирующий потенциал данного метода. Поскольку мтДНК не подвержена рекомбинации, ее следует рассматривать как единый локус. Полиморфизм мтДНК столь высок, что иногда один его анализ может обеспечить до-

статочно надежную идентификацию или подтверждение родства [4].

Кроме того, в каждой клетке человека или животного содержится от нескольких сотен до тысячи митохондрий и, соответственно, такое же количество копий молекул мтДНК. Все это повышает вероятность сохранения пригодной для исследования мтДНК в биологических объектах, содержащих ДНК в малых количествах или деградированную (например, в костных тканях, волосах, шерсти). Анализ мтДНК возможен, если для экспертного исследования доступны крайне малые количества биологического материала и хромосомная ДНК не может быть амплифицирована [5].

Для унификации подходов к видовой идентификации живых организмов канадский ученый Пол Хеберт (Paul David Neil Hebert) в 2003 году предложил использовать короткие стандартные последовательности ДНК (их называют ДНК-штрихкод, DNA barcode). В 2004 году был основан международный консорциум «Штрихкод жизни» (Consortium for the Barcode of Life – CBOL), который объединил 69 организаций из 31 страны. Цель консорциума – сохранение биоразнообразия на Земле. Но прежде чем его сохранять, необходимо его описать. Поэтому CBOL создает единую методическую и информационную систему, которая позволит описать все существующие на Земле виды животных и растений, а также поспособствует идентификации новых, ранее неизвестных науке видов [6].

Для установления последовательностей ДНК-штрихкода разных групп организмов разработаны универсальные праймерные тест-системы, опубликованы отработанные

ные протоколы [7], применяемые, в первую очередь, в исследовательских целях. Полученные последовательности публикуются в открытом доступе в международных базах данных.

На данный момент существуют три глобальные базы нуклеотидных последовательностей: GenBank, EMBL, DNA Data Bank of Japan, – и отдельная база данных, содержащая результаты ДНК-штрихкодирования – BOLD system. Наиболее развитым и популярным с ресурсом является GenBank. Это открытая база данных, содержащая все аннотированные последовательности нуклеиновых кислот, а также закодированных в них белков. GenBank поддерживается Национальным центром биотехнологической информации (National Center for Biotechnological Information – NCBI), входящим в состав национальных институтов здоровья США, и доступна исследователям всего мира. В настоящее время GenBank содержит несколько миллионов последовательностей нуклеиновых кислот, относящихся более чем к ста тысячам различных организмов. Пополнение базы происходит за счет предоставления исследователями своих научных результатов, причем данные не проходят проверку – ответственность за точность и полноту информации несут сами исследователи [8].

В Российской Федерации основной проблемой существующих генетических баз данных животных, растений и микроорганизмов является их разрозненность, что ведет к ограниченности применения имеющейся в них информации. В научных учреждениях, которые занимаются исследованием ДНК животных, растений, микроорганизмов и т. п., имеются массивы генетических данных об исследуемых объектах, однако они недоступны для судебно-экспертных учреждений (СЭУ). Кроме того, эти данные не всегда актуальны для СЭУ в исходном виде в силу различных целей и способов исследования биологических объектов.

В государственных СЭУ, прежде всего – правоохранительных органов России, сформированы так называемые справочно-информационные фонды (СИФ), которые представляют собой натурные коллекции и описания объектов.

В экспертно-криминалистических подразделениях органов внутренних дел СИФ входят в состав справочно-вспомогательных учетов, которые, в свою очередь, в соответствии с нормативными актами МВД

России являются частью системы криминалистической регистрации [9].

Однако в сфере информационных массивов данных ДНК имеется только федеральная база данных геномной информации, содержащая данные ДНК только человека, ее функционирование регламентируется Федеральным законом от 08.12.2009 № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации».

Таким образом, идея создания информационно-аналитической системы хранения и обработки генетических данных «Национальная база генетической информации», которая содержала бы доступную для отечественных ученых систематизированную генетическую информацию (генетические данные) животных, растений и микроорганизмов, представляется целесообразной<sup>1</sup>.

В настоящее время при производстве экспертных исследований для решения вопроса о таксономической принадлежности животного в большинстве случаев необходимо использовать указанные выше зарубежные базы данных как единственно возможный источник проведения сравнительного анализа ДНК. Кроме того, в некоторых случаях универсальные праймерные тест-системы не подходят для экспертного исследования. Так, известно, что при амплификации с помощью универсальных праймеров «ДНК-штрихкода» из образцов крови птиц высока вероятность амплификации не только искомого фрагмента мтДНК, но и схожих последовательностей, так называемых ядерных митохондриальных псевдогенов (nuclear mitochondrial DNA segments – NUMTs) [10]. Неспецифичность реакции приводит к невозможности установления истинной последовательности искомого фрагмента мтДНК.

Таким образом, несмотря на существенное методическое сходство и использование аналогичного оборудования, анализ ДНК объектов животного происхождения в судебной экспертизе значительно сложнее анализа ДНК объектов, происходящих от человека, и требует внесения дополнений в используемые методы исследования.

Целью данной работы было установление видовой принадлежности объекта животного происхождения – лакомства для

<sup>1</sup> Перечень поручений по итогам совещания по вопросам развития генетических технологий (утв. Президентом Российской Федерации 04.06.2020 № Пр-920). <http://kremlin.ru/acts/assignments/orders/63461> (дата обращения: 07.02.2025).

домашних животных «Сублимированная акула». Несмотря на то, что это исследование проводилось вне рамок судебной молекулярно-генетической экспертизы, его результаты представляют собой иллюстрацию возможных методических проблем, связанных с установлением видовой принадлежности редко встречающихся, уникальных объектов животного происхождения молекулярно-генетическими методами.

### 1. Материалы и методы

Объектом исследования послужило лакомство для собак, кошек и грызунов «Сублимированная акула», представленное в упаковке на российском маркетплейсе (рис. 1).

ДНК из объекта выделяли с помощью набора DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. В качестве маркеров были использованы два участка мтДНК. Первый маркер – это ДНК-штрихкод (фрагмент 650 п. н. митохондриального гена *COI*), для амплификации которого использовались универсальные праймеры для рыб VF2\_t1: TGAAAACGACGGCCAGTCAACCAAC CACAAGACATTGGCAC, FishR2\_t1 rev\_seq: CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGAC CGAAGAATCAGAA [11], набор реактивов 5xMAS<sup>DP</sup>Mix-2025 (Диалат, Россия) и программа ПЦР с параметрами 95 °С 5 мин; 35 циклов: 95 °С 30 сек, 52 °С 40 сек, 72 °С 1 мин; 72 °С 10 мин.

Второй маркер – это фрагмент митохондриального гена *ND2* (NADH dehydrogenase subunit 2), ранее применявшийся для молекулярной идентификации хрящевых рыб Тайваня [12]. Для амплификации использовали специально сконструированные с помощью программного пакета

Lasergene (DNASar, США) праймеры SCNDf 5'-CTTGACCGTTACACTTCTGATTA-3' и SCNDr 5'-GTTGGGTTTGGGCTTATGGTTA-3' на фрагмент длиной 605 п. н., набор реактивов 5xMAS<sup>DP</sup>Mix-2025 (Диалат, Россия) и программу ПЦР с параметрами 95 °С 5 мин, 35 циклов: 95 °С 30 сек, 56 °С 40 сек, 72 °С 1 мин; 72 °С 10 мин.

Секвенирование по Сэнгеру проводили на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Синтол, Россия) с помощью набора реактивов GenSeq (Синтол, Россия). Обработку результатов осуществляли с помощью программного пакета Lasergene (DNASar, США).

Определение таксономической принадлежности представленной на исследование высушенной рыбы по полученным последовательностям генов проводили с помощью алгоритма BLAST (NCBI, США) «highly similar» для поиска последовательностей с максимальным сходством, руководствуясь рекомендациями по использованию данного алгоритма для определения видовой принадлежности животных<sup>2</sup> [ГОСТ 34106-2017].

### 2. Результаты

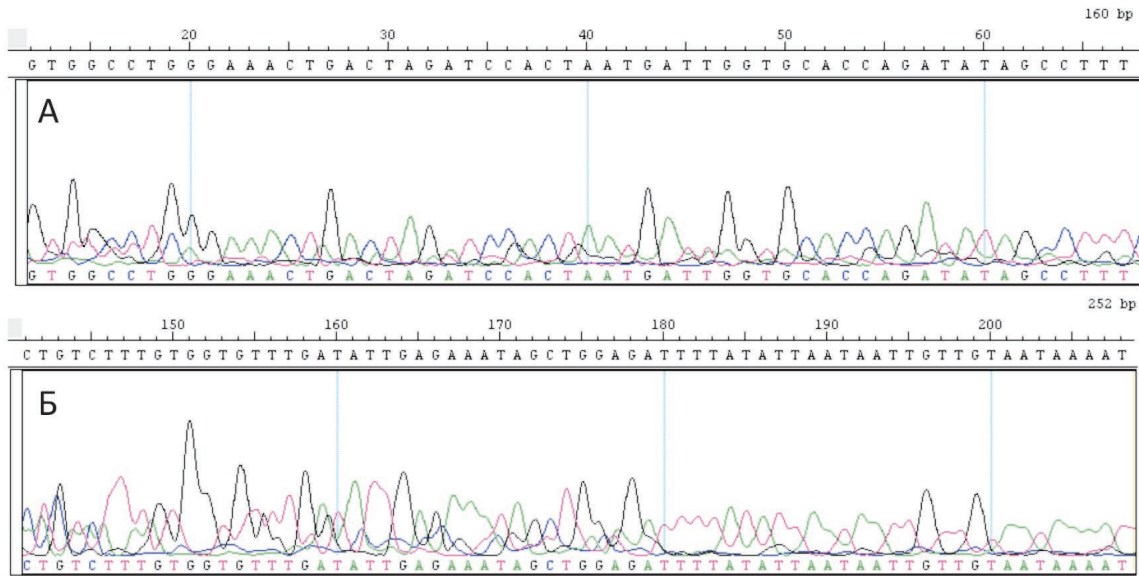
#### 2.1. Амплификация и секвенирование баркодингового фрагмента митохондриального гена *COI*

В результате амплификации и секвенирования баркодингового фрагмента митохондриального гена *COI* удалось получить ПЦР-продукт искомого размера. Однако

<sup>2</sup> ГОСТ 34106-2017. Продукция пищевая и сырье. Метод секвенирования фрагментов митохондриального генома животных и рыб для определения видовой принадлежности в однокомпонентной продукции. М.: Стандартинформ, 2017. 17 с.



**Рис. 1.** Внешний вид лакомства для собак, кошек и грызунов «Сублимированная акула» в упаковке  
**Fig. 1.** Appearance of treats for dogs, cats and rodents “Freeze-dried shark” in a package



**Рис. 2.** Типичный фрагмент результатов секвенирования по Сэнгеру фрагмента митохондриального гена *COI* общей длиной 658 п. н. в программе SeqMan (DNASar, США): А – с праймером VF2\_t1, Б – с праймером FishR2\_t1

**Fig. 2.** Sanger sequencing pattern of the 658-bp long mitochondrial *COI* gene barcoding fragment analysed using SeqMan (DNASar, USA) software and primers: А – VF2\_t1; Б – FishR2\_t1

при секвенировании данного продукта ни с одним из праймеров в нескольких повторностях не удалось получить электрофореграммы продукта, позволяющие провести установление вида с достаточной точностью. Типичные образцы электрофореграмм продуктов секвенирования представлены на рисунке 2.

Тем не менее, для проведения предварительного анализа возможной таксономической принадлежности объекта с помощью алгоритма BLAST (в случае совмещенных пиков для анализа использовали автоматически определенный нуклеотид, указанный первым в скобках) с целью выявления наиболее вероятных видов, требующих дифференциации, нами были выбраны участки наиболее качественного сигнала (здесь и далее в скобках – парные пики оснований, размер буквы обозначает сравнительную высоту пика):

75 п. н. с праймером FishR2\_t1:

5'- GATTTTATA(T/g)AATAATT(G/c)TT(G/c)TAA(T/c/g)AA(A/t)(A/g)TT(A/g)A(T/g)(T/c)(G/c)AG(G/a)C(T/g)A(A/g)AATTGA(T/C)GAAACACCAG(C/t)CAAGTGAAGGA(A/t)-3'

и 82 п. н. с праймером VF2\_t1:

5'- (G/a)G(A/t)A(A/t)CT(a)GA(C/a)TAG(A/T)T(C/t)(C/g)ACT(g)(A/g)(A/g)(T/a)GA(T/A)(T/A)(G/a)GT(G/a)C(A/t)(C/t)(C/g)AG(A/g)(T/G)ATAG(C/A)CT(T/g)(T/a)C(C/g)A(C/g)

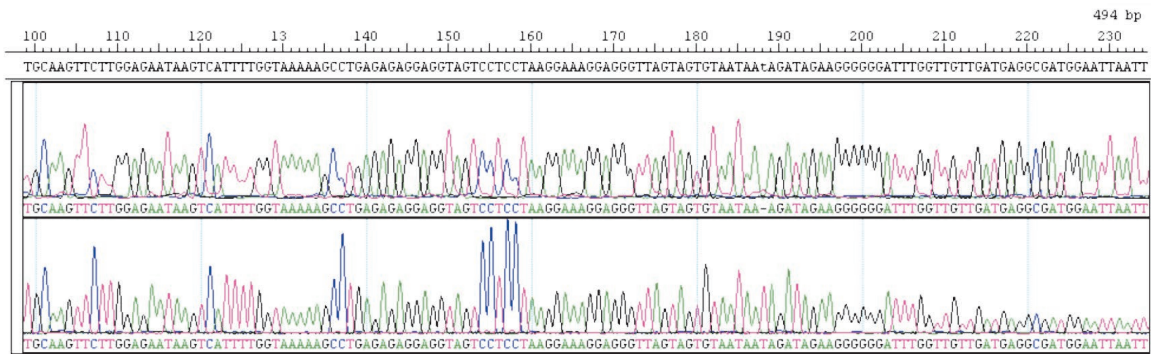
(G/a)AA(T/C)(A/c)A(A/g)T(A/g/c)AT(A/g)(T/a)GAG(C/G)(T/g)(T/g)(T/a)(T/a)(G/a)AC(T/a)C(C/a)(T/g)(T/c)(C/g)-3'

## 2.2. Амплификация и секвенирование фрагмента митохондриального гена *ND2*

В результате амплификации и секвенирования фрагмента митохондриального гена *ND2* удалось получить последовательности, пригодные для определения таксономической принадлежности исследуемой продукции с помощью алгоритма BLAST. Типичные образцы электрофореграмм продуктов секвенирования представлены на рисунке 3.

Последовательность фрагмента 494 п. н., полученная двусторонним прочтением с помощью праймеров SCNDf и SCNDr:

5'-ATGGTTAGTGTGTAGCATAACATAGGCGTAAATAAAAAGAATAAGCTTAAAAGTGCTGTGAGGGCTATGATGGTAGCTAAGATAAATAGATTTTGTCTTGGCAAGTCTTGGAGAATAAGTCATTTTGGTAAAAAGCCTGAGAGAGGAGGTAGTCCTCCTAAGGAAAGGAGGGTTAGTGTGTAATAAAGATAGAAGGGGGGATTTGGTTGTGATGAGGCGATGGAATTAATTTAGTTGAGTTAAAGGTTTTAAATAAGGGAAGGTTGTGAGTGTAAAAGAATATATAAATAAGGTTAAGGAGGGTTAAGTTAGGGGTATAATGTAATAATTGTAATTATTCATCCAAGATTTGCGATTGATGAATAGGCTAGAATTTTTCGTAATTGTGTTTGATTAAGCCCTCCTCACCCCTCCAACAATT



**Рис. 3.** Типичный фрагмент результатов секвенирования по Сэнгеру фрагмента митохондриального гена *ND2* общей длиной 494 п. н. в программе SeqMan (DNASar, США): с праймером SCNDf (вверху), с праймером SCNDr (внизу)

**Fig. 3.** Sanger sequencing pattern of the 494-bp long mitochondrial *ND2* gene fragment analysed using SeqMan (DNASar, USA) software and primers: SCNDf (at the top), SCNDr (below)

GTTGAAAGGACACCCAGAAATAGTAATAATTCG  
GGGTTAAGTAATGGGTAAAGTTGAAGAAGAATA  
GC-3'

Определение таксономической принадлежности с помощью алгоритма BLAST и анализ данных базы

GenBank Результаты анализа полученных последовательностей (75 и 82 п. н. для фрагмента гена *COI* и 494 п. н. для фрагмента гена *ND2*) с помощью алгоритма BLAST представлены в таблице 1.

Можно видеть, что в зависимости от использованного фрагмента (и его качества) результаты видовой идентификации существенно отличаются: от 100% совпадения с большим количеством последовательностей желтой остроносой акулы *Scoliodon laticaudus* по низкокачественной последовательности фрагмента гена *COI* длиной 75 п. н. до 100% совпадения с большим количеством фрагментов *Scoliodon macrorhynchos* для высококачественного и более длинного

**Таблица 1.** Результаты анализа полученных последовательностей с помощью алгоритма BLAST  
**Table 1.** BLAST analysis results for base sequences of the mtDNA fragments

Фрагмент	Вид	Кол-во последовательностей из 100 в выдаче алгоритма BLAST	Номера примеров совпадающих последовательностей в GenBank	Совпадение <sup>1</sup> , %	E-value <sup>2</sup>
<i>COI</i> 75 п. н.	<i>Scoliodon laticaudus</i>	100	MW974651.1	100 (75/75)	3*10 <sup>-29</sup>
	<i>Scoliodon macrorhynchos</i>	0	MW313869.1	98,63 (72/73)	9*10 <sup>-32</sup>
<i>COI</i> 82 п. н.	<i>Scoliodon laticaudus</i>	76	MW974679.1-NC_018052.1	97,56 (80/82) – 98,78 (81/82)	1*10 <sup>-29</sup> - 2*10 <sup>-31</sup>
	<i>Scoliodon macrorhynchos</i>	21	MW313869.1	98,75 – 98,78 (81/82)	3*10 <sup>-30</sup> - 2*10 <sup>-31</sup>
	<i>Rhizoprionodon acutus</i>	1	NC_046016.1	98,78 (81/82)	2*10 <sup>-31</sup>
	<i>Etmopterus lucifer</i>	2	EF607380.1	98,78 (81/82)	2*10 <sup>-31</sup>
<i>ND2</i> 494 п. н.	<i>Scoliodon laticaudus</i>	18	ON228810.1 (MZ778857.1)	97,77 (483/494) – 100 (494/494)	0.0
	<i>Scoliodon macrorhynchos</i>	81	OM102478.1	100 (494/494)	0.0
	<i>Rhizoprionodon acutus</i>	1	NC_046016.1	99,80 (493/494)	0.0

<sup>1</sup>Совпадение – проценты совпавших нуклеотидов из общей длины последовательности (количество п. н./общая длина последовательности п. н.), минимальное и максимальное значение из 100 последовательностей выдачи алгоритма BLAST

<sup>2</sup>E-value – значение E-value (вероятности случайного совпадения последовательностей), вычисленное при помощи алгоритма BLAST

фрагмента гена *ND2*. При этом следует отметить, что в выдаче алгоритма BLAST присутствовали и последовательности вида *Scoliodon laticaudus*, также показавшие стопроцентное совпадение с анализируемым фрагментом гена *ND2*, но в существенно меньшем количестве.

Также для всех проанализированных последовательностей в выдаче алгоритма BLAST присутствуют единичные последовательности видов других родов акул: *Rhizoprionodon acutus* и *Etmopterus lucifer*. Для проверки мы с помощью алгоритма BLAST также провели сравнение полученных последовательностей со всеми имеющимися в базе GenBank фрагментами соответствующих генов *Rhizoprionodon acutus* и *Etmopterus lucifer*. Для *Rhizoprionodon acutus*, помимо последовательности полного митохондриального генома, номер которой указан в таблице 1, в базе данных представлены еще два фрагмента гена *ND2*, имеющие процент совпадений не более 84 %, а для фрагмента *COI* имеются не менее 99 последовательностей в базе, показывающих процент совпадения не выше 93 %. Для *Etmopterus lucifer* и фрагмента *COI* длиной 82 п.н. в базе присутствуют 3 последовательности, совпадающие на 98.78 %, и еще 24 аналогичные последовательности, опубликованные теми же авторами, уровень сходства которых с полученной нами последовательностью настолько низок, что они не попадают в результаты алгоритма BLAST «highly similar».

В связи с этим мы исключили возможность принадлежности анализируемого нами объекта к видам *Rhizoprionodon acutus* и *Etmopterus lucifer* (для исключения последнего также принимали во внимание окраску исследуемой рыбы, так как *Etmopterus lucifer* имеет темную окраску).

Что касается идентификации объекта исследования как *Scoliodon macrorhynchus* или *Scoliodon laticaudus*, исходя из сравнительных результатов оценки качества и количества последовательностей, объект идентифицирован нами как *Scoliodon macrorhynchus*. Результаты установления видовой принадлежности были подтверждены морфометрическим анализом (данные не приведены).

### 3. Обсуждение результатов

Установление видовой принадлежности лакомства для собак, кошек и грызунов «Сублимированная акула», представленного

в продаже на российском маркетплейсе, проведенное нами молекулярно-генетическими методами в исследовательских целях, представляет собой пример установления видовой принадлежности единичного объекта редкого вида, не представленного в отечественной фауне и не имеющего существенного хозяйственного значения в Российской Федерации. Вместе с тем, виды *Scoliodon macrorhynchus* и *Scoliodon laticaudus*, как и остальные представители Carcharinidae, внесены в Приложение II Конвенции о международной торговле видами дикой флоры и фауны, находящимися под угрозой исчезновения, от 1973 г. (СИТЕС). Таким образом, данное исследование вполне актуально в рамках практики судебного экспертного анализа ДНК объектов животного происхождения.

Особенностью проведенного анализа является тот факт, что рекомендованная для подобных случаев методика – ДНК-штрихкодирование с универсальными праймерами для рыб – может показать неудовлетворительный результат секвенирования. Согласно ГОСТ 34106-2017 последовательности такого качества не могут быть использованы для идентификации, так как получение такой последовательности должно быть интерпретировано как неоднокомпонентность пробы, которая, соответственно, не подлежит анализу. Однако подобный результат секвенирования может быть вызван неспецифическим связыванием универсальных праймеров с ДНК-матрицей, включая ядерные митохондриальные псевдогены. Это приводит к неоднокомпонентности продукта ПЦР однокомпонентной пробы, которая может быть проанализирована с помощью других праймеров, обладающих большей специфичностью, или других маркеров.

Для решения задачи нами была проведена исследовательская работа: по результатам анализа литературы выбран маркер мтДНК, отличный от баркодингового фрагмента, но описанный в качестве маркера видовой принадлежности для акул, а также сконструированы специфические праймеры для амплифицирования короткого фрагмента ДНК в расчете на плохую сохранность ДНК в образце сублимированной рыбы. Результатом работы стала последовательность фрагмента гена *ND2*, удовлетворительного для идентификации с помощью алгоритма BLAST

в соответствии с требованиями ГОСТ 34106-2017.

Однако использование алгоритма BLAST также не позволило получить однозначный результат для видовой идентификации: помимо стопроцентного совпадения с 81 последовательностью вида *Scoliodon macrorhynchos*, в выдаче присутствовали последовательности, аннотированные как последовательности вида *Scoliodon laticaudus*, также совпадающие на 100 %, и одна последовательность, аннотированная как последовательность вида *Rhizoprionodon acutus*, отличающаяся единственным нуклеотидом из 494. Поскольку, согласно ГОСТ 34106-2017, в случае наличия последовательностей со стопроцентным совпадением последовательность *Rhizoprionodon acutus* в данном случае можно исключить и идентифицировать образец как принадлежащий к роду *Scoliodon*. В данном случае оба вида являются охраняемыми и имеют одинаковый природоохранный статус. Тем не менее известны ситуации, в которых подобный результат анализа не позволит решить задачу сравнительной идентификации видов с разным природоохранным статусом: у особо ценных видов крупных соколов балобана и кречета, например, присутствует полное совпадение последовательностей некоторых митохондриальных маркеров [13, 14]. При этом балобан включен в Приложение II Конвенции СИТЕС, а кречет – в приложение I данной Конвенции.

Полученный нами результат объясняется, в первую очередь, особенностями базы данных GenBank, в которой отсутствует механизм проверки качества аннотирования добавляемых исследователями последовательностей. Таким образом, одним из возможных объяснений неоднозначных результатов идентификации по последовательностям мтДНК-маркеров с помощью алгоритма BLAST может быть неверная видовая идентификация образцов в предшествующих исследованиях и, соответственно, неверное аннотирование последовательностей, внесенных в базу. Именно это объяснение представляется верным в случае единственной полученной нами в выдаче алгоритма BLAST последовательности *Rhizoprionodon acutus*, которая представляет собой последовательность полного митохондриального генома, но существенно отличается от последовательностей от-

дельных фрагментов данного вида, полученных в других исследованиях.

Для маркеров мтДНК и видов с малоизученной популяционно-генетической структурой возможны также случаи неизвестной и, соответственно, не описанной интрогрессии мтДНК одного вида в геном другого в результате гибридизационных событий, вплоть до полного замещения митохондриального генома вида [15]. В последнем случае маркеры мтДНК полностью непригодны для сравнительной идентификации данных видов. Весьма вероятно, что именно митохондриальная интрогрессия объясняет наличие в базе данных GenBank идентичных последовательностей генов, в первую очередь, *COI* («молекулярного штрих-кода» вида), а также *ND2*, аннотированных для близкородственных видов рода *Scoliodon* семейства серых акул отряда кархаринообразных *S. macrorhynchos* и *S. laticaudus*. При этом описания явления интрогрессии митохондриального генома между этими двумя видами нам в литературе обнаружить не удалось.

Еще одним весьма вероятным объяснением неоднозначности результатов использования алгоритма BLAST является сравнительно недавнее выделение *S. macrorhynchos* в качестве отдельного вида – до 2010 года желтая остроносая акула *S. laticaudus* считалась единственным видом рода, соответственно, все последовательности образцов были аннотированы как принадлежащие этому виду [16]. Однако часть последовательностей гена *ND2*, совпадающих с полученной нами, но аннотированных как последовательности *S. laticaudus*, опубликованы в базе GenBank в 2022–2023 гг. Таким образом, наиболее вероятными объяснениями остаются неверная идентификация видовой принадлежности исследуемых объектов, последовательности которых опубликованы в GenBank, или существование интрогрессии митохондриального генома у видов рода *Scoliodon*.

Представленность последовательностей в базе GenBank в данном случае позволила сделать вывод об установлении видовой принадлежности исследуемого объекта по результатам ДНК-анализа. Тем не менее, полученные нами результаты показывают возможность существования в практике отдельных случаев, когда анализ ДНК с помощью рекомендованных

методик не позволяет получить однозначный результат. Эти случаи потребуют исследовательской работы, по итогам которой, вероятно, невозможно будет сделать однозначный вывод. В силу разнообразия животного мира и недостаточной исследованности значительной части его генетического разнообразия невозможно создание полностью универсальной методики, покрывающей все возможные задачи, в то же время создание и стандартизация общих рекомендованных методик для каждого такого индивидуального случая нецелесообразна с точки зрения временных и экономических затрат. При этом представляется целесообразным сохранение результатов подобных исследований уникальных объектов на случай возникновения идентичной задачи. При этом, отходя от общеупотребимых баз данных типа GenBank, необходимо обеспечить возможность верификации результатов (сохранение объектов в коллекции, определение объектов иными

методами и т. д.) во избежание вышеописанных проблем.

Таким образом, результаты данной работы показывают, что исследование неизвестных объектов животного происхождения методами ДНК-анализа в целях судебной экспертизы будет в некоторых случаях требовать разработки и применения уникальных частных экспертных методик, а также демонстрируют целесообразность создания в России единой национальной базы данных генетической информации с соответствующими требованиями контроля.

#### Благодарности

Подготовка данной статьи осуществлена Л.С. Зиневич и Н.Б. Коростелевым в рамках Госзадания Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН № 075-00424-25-03, А.М. Орловым в рамках Госзадания Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН FMWE-2024-0022.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Serite C.P., Ntshudisane O.K., Swart E. *et al.* Limitations of DNA Barcoding in Determining the Origin of Smuggled Seahorses and Pipefishes // *Forensic Science International: Animals and Environments*. 2021. Vol. 1. 100006. <http://doi.org/10.1101/2020.12.09.417998>
2. Шеховцов С.В., Шеховцова И.Н., Пельтек С.Е. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // *Успехи современной биологии*. 2019. Т. 139. № 3. С. 211–220. <https://doi.org/10.1134/S0042132419030074>
3. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball Sh.L. *et al.* Biological Identifications through DNA Barcodes // *Proceedings of the Royal Society B*. 2003. Vol. 270. No. 1512. P. 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
4. Колесников А.А., Герасимов Е.С. Множественность вариантов организации митохондриального генома // *Успехи биологической химии*. 2012. Т. 52. С. 37–62.
5. Культин А.Ю., Стороженко И.В., Пименов М.Г. и др. Криминалистическое исследование митохондриальной ДНК биологических следов человека. Методические рекомендации. М.: ЭКЦ МВД России, 2008. 80 с.
6. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование видов животных и растений – способ их молекулярной идентификации и изучения биоразнообразия // *Журнал общей биологии*. 2009. Т. 70. № 4. С. 296–315.
7. Kress W., Erickson D. *DNA Barcodes. Methods and Protocols*. Vol. 858. Washington, DC: Humana Press: Totowa, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1)

#### REFERENCES

1. Serite C.P., Ntshudisane O.K., Swart E. *et al.* Limitations of DNA Barcoding in Determining the Origin of Smuggled Seahorses and Pipefishes. *Forensic Science International: Animals and Environments*. 2021. Vol. 1. 100006. <http://doi.org/10.1101/2020.12.09.417998>
2. Shekhovtsov S.V., Shekhovtsova I.N., Peltek S.E. DNA Barcoding: Methods and Approaches. *Uspehi sovremennoj biologii*. 2019. Vol. 139. No. 3. P. 211–220. (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/S0042132419030074>
3. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball Sh.L. *et al.* Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*. 2003. Vol. 270. No. 1512. P. 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
4. Kolesnikov A.A., Gerasimov E.S. The Multiplicity of the Mitochondrial Genome Structure Variants. *Advances in biological chemistry*. 2012. Vol. 52. P. 37–62. (In Russ.).
5. Kultin A.Yu., Storozhenko I.V., Pimenov I.G. *et al.* *Forensic Examination of Mitochondrial DNA of Human Biological Traces. Methodological Recommendations*. Moscow: EKTS MVD Rossii, 2008. 80 p. (In Russ.).
6. Shneer V.S. DNA Barcoding of Animal and Plant Species as a Way of Their Molecular Identification and Biodiversity Study. *Biology Bulletin Reviews*. 2009. Vol. 70. No. 4. P. 296–315. (In Russ.).
7. Kress W., Erickson D. *DNA Barcodes. Methods and Protocols*. Vol. 858. Washington, DC: Humana Press: Totowa, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1)

- 
8. Rodrigues C.R., de Carvalho D.E.V., Garcia Y. *et al.* DNA Barcode as an Effective Tool in the Identification of Billfishes (Scombroidei, Teleostei) from Exported Specimens // *Forensic Science International: Animals and Environments*. 2021. Vol. 1. P. 100028. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100028>
9. Основы судебной экспертологии: учебно-методическое пособие. М.: ФБУ РФЦСЭ при Минюсте России, 2023. 383 с.
10. Lijtmaer D.A., Kerr K.C.R., Stoeckle M.Y. *et al.* DNA Barcoding Birds: from Field Collection to Data Analysis. In: Kress W., Erickson D. (ed.). *DNA Barcodes*. Washington, DC: Humana Press, Totowa, 2012. Vol. 858. P. 127–152.
11. Staats M., Arulandhu A.J., Gravendeel B. *et al.* Advances in DNA Metabarcoding for Food and Wildlife Forensic Species Identification // *Anal Bioanal Chem*. 2016. Vol. 408. No. 17. P. 4615–4630. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>
12. Straube N., White W., Ho C.-H. *et al.* A DNA Sequence-Based Identification Checklist for Taiwanese Chondrichthyans // *Zootaxa*. 2013. Vol. 3752. No. 1. P. 256–278. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.3752.1.16>
13. Nittinger F., Haring E., Pinsker W. *et al.* Out of Africa? Phylogenetic relationships between Falco Biarmicus and the Other Hierofalcons (Aves: Falconidae) // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2005. Vol. 43. No. 4. P. 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00326.x>
14. Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W. *et al.* Phylogeography and Population Structure of the Saker Falcon (*Falco Cherrug*) and the Influence of Hybridization: Mitochondrial and Microsatellite Data // *Molecular Ecology*. 2007. No. 7. P. 1497–1517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x>
15. Sloan D.B., Havird J.C., Sharbrough J. The On-Again, Off-Again Relationship between Mitochondrial Genomes and Species Boundaries // *Molecular Ecology*. 2017. Vol. 26. No. 8. P. 2212–2236. <https://doi.org/10.1111/mec.13959>
16. White W.T., Last P.R., Naylor G.J.P. Scoliodon Macrorhynchos (Bleeker, 1852), a Second Species of Spadenose Shark from the Western Pacific (Carcharhiniformes: Carcharhinidae) // *Descriptions of New Sharks and Rays from Borneo. CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper*. 2010. Vol. 32. P. 61–76.
8. Rodrigues C.R., de Carvalho D.E.V., Garcia Y. *et al.* DNA Barcode as an Effective Tool in the Identification of Billfishes (Scombroidei, Teleostei) from Exported Specimens. *Forensic Science International: Animals and Environments*. 2021. Vol. 1. P. 100028. <https://doi.org/10.1016/j.fsiae.2021.100028>
9. Fundamentals of Forensic Expertology: Educational and Methodological Guide. Moscow: RFCFS, 2023. 384 p. (In Russ.).
10. Lijtmaer D.A., Kerr K.C.R., Stoeckle M.Y. *et al.* DNA Barcoding Birds: from Field Collection to Data Analysis. In: Kress W., Erickson D. (ed.). *DNA Barcodes*. Washington, DC: Humana Press, Totowa, 2012. Vol. 858. P. 127–152.
11. Staats M., Arulandhu A.J., Gravendeel B. *et al.* Advances in DNA Metabarcoding for Food and Wildlife Forensic Species Identification. *Anal Bioanal Chem*. 2016. Vol. 408. No. 17. P. 4615–4630. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>
12. Straube N., White W., Ho C.-H. *et al.* A DNA Sequence-Based Identification Checklist for Taiwanese Chondrichthyans. *Zootaxa*. 2013. Vol. 3752. No. 1. P. 256–278. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.3752.1.16>
13. Nittinger F., Haring E., Pinsker W. *et al.* Out of Africa? Phylogenetic relationships between Falco Biarmicus and the Other Hierofalcons (Aves: Falconidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2005. Vol. 43. No. 4. P. 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2005.00326.x>
14. Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W. *et al.* Phylogeography and Population Structure of the Saker Falcon (*Falco Cherrug*) and the Influence of Hybridization: Mitochondrial and Microsatellite Data. *Molecular Ecology*. 2007. No. 7. P. 1497–1517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x>
15. Sloan D.B., Havird J.C., Sharbrough J. The On-Again, Off-Again Relationship between Mitochondrial Genomes and Species Boundaries. *Molecular Ecology*. 2017. Vol. 26. No. 8. P. 2212–2236. <https://doi.org/10.1111/mec.13959>
16. White W.T., Last P.R., Naylor G.J.P., 2010. Scoliodon Macrorhynchos (Bleeker, 1852), a Second Species of Spadenose Shark from the Western Pacific (Carcharhiniformes: Carcharhinidae). *Descriptions of New Sharks and Rays from Borneo. CSIRO Marine and Atmospheric Research Paper*. 2010. Vol. 32. P. 61–76.
-

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**Зиневич Людмила Сергеевна** – к. б. н., судебный эксперт отдела молекулярно-генетической экспертизы ФБУ РФЦСЭ имени профессора А.Р. Шляхова при Минюсте России; научный сотрудник ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва; e-mail: lzinevich@gmail.com

**Рыбакова Анна Анатольевна** – начальник отдела молекулярно-генетической экспертизы ФБУ РФЦСЭ имени профессора А.Р. Шляхова при Минюсте России; e-mail: rybkaa@rambler.ru

**Орлов Алексей Маркович** – д. б. н., руководитель лаборатории, главный научный сотрудник Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН; e-mail: orlov.am@ocean.ru

**Коростелев Николай Борисович** – младший научный сотрудник Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН; e-mail: korostelevnb@gmail.com

**Рашидова Гузель Фаткулловна** – к. б. н., ведущий государственный судебный эксперт отдела молекулярно-генетической экспертизы ФБУ РФЦСЭ имени профессора А.Р. Шляхова при Минюсте России e-mail: g.rashidova@sudexpert.ru

**Стороженко Ирина Владиленовна** – к. б. н., ведущий государственный судебный эксперт отдела молекулярно-генетической экспертизы ФБУ РФЦСЭ имени профессора А.Р. Шляхова при Минюсте России; e-mail: irinastor@rambler.ru

#### ABOUT THE AUTHORS

**Zinevich Liudmila Sergeevna** – Cand. Sc. (Biology), Forensic expert, Department of Molecular Genetic Examination, Shlyakhov RFCFS; Research Scientist of the A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences; e-mail: lzinevich@gmail.com

**Rybakova Anna Anatol'evna** – Head of Department of Molecular Genetic Examination, Shlyakhov RFCFS; e-mail: rybkaa@rambler.ru

**Orlov Alexei Markovich** – D. Sc. (Biology), Head of Laboratory, Chief Research Scientist of the Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences; e-mail: orlov.am@ocean.ru

**Korostelev Nikolai Borisovich** – Junior Research Scientist of the A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences; e-mail: korostelevnb@gmail.com

**Rashidova Guzel' Fatkullovna** – Cand. Sc. (Biology), Leading State Forensic Expert, Department of Molecular Genetic Examination, Shlyakhov RFCFS; e-mail: g.rashidova@sudexpert.ru

**Storozhenko Irina Vladilenovna** – Cand. Sc. (Biology), Leading State Forensic Expert, Department of Molecular Genetic Examination, Shlyakhov RFCFS; e-mail: irinastor@rambler.ru

*Статья поступила: 22.09.2025*

*После доработки: 06.10.2025*

*Принята к печати: 15.10.2025*

*Received: September 22, 2025*

*Revised: October 06, 2025*

*Accepted: October 15, 2025*