

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию БЕЛОКОНЯ Юрия Сергеевича

«ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ КЕДРОВОГО СТЛАНИКА, *PINUS PUMILA* (PALL.) REGEL, В ВОСТОЧНОЙ ЧАСТИ АРЕАЛА»,

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Актуальность. Генетическое разнообразие является необходимой предпосылкой адаптации живых организмов и их сообществ в гетерогенной среде обитания. В условиях современных глобальных изменений природной обстановки анализ величины и структуры генетической изменчивости таких важных эдификаторов как кедровый стланик, имеет безусловную актуальность. Во Введении автор дает краткую характеристику *Pinus pumila*, его экологии, распространения, экологического и экономического значения. Отмечено, что популяционно-генетические исследования кедрового стланика до настоящего времени носили локальный характер и не охватывали всего ареала.

Целью работы обозначено изучение генетической структуры и механизмов ее формирования в популяциях кедрового стланика из восточной части ареала.

Задачами работы являются изучение величины и структуры генетической изменчивости, в том числе географической структуры, анализ связи частот аллозимных аллелей с климатическими параметрами, изучение структуры родственных связей в пределах популяций, изучение системы скрепления в популяциях кедрового стланика и её связи с динамикой параметров изменчивости в ходе жизненного цикла растений, исследование интрогрессивной гибридизации с кедром сибирским.

Научная новизна. Работа Белокопя Ю.С. является первым исследованием кедрового стланика, включающим основную часть ареала. Впервые показана подразделенность популяций на отдельные кластеры: южный – юг Камчатки, Курилы, Сахалин, юг Приморья, камчатский – Камчатка, Чукотка, и западный – Восточная Сибирь. Такая подразделенность проливает свет на биогеографию и историю бореальной растительности Северо-Восточной Азии.

Впервые показано наличие семейной структуры в популяциях кедрового стланика, что связано с его зоохорией.

Впервые подробно исследована система скрещивания стланика и динамика параметров изменчивости, обусловленная элиминацией инбредных индивидуумов в ходе онтогенеза. Впервые показано, что распространение кедра сибирского в восточной части ареала кедрового стланика, как и в Забайкалье, обусловлено асимметричной интрогрессивной гибридизацией с кедровым стлаником.

Впервые выявлены корреляции частот аллелей ряда локусов с географическими координатами и биоклиматическими переменными, возможно отражающие экологическую дифференциацию в гетерогенных условиях среды.

Представляемая диссертация может рассматриваться в качестве важного этапа изучения генетического разнообразия и биогеографии *P. pumila* и может служить основой дальнейших исследований с использованием более информативных маркеров.

Теоретическая и практическая значимость исследования не вызывает сомнения.

Работа выполнена на основе аллозимных локусов, изменчивость которых имеет потенциальное селективное значение. Понимание механизмов реализации генетической изменчивости популяций стланика через аллозимные фенотипы может помочь в дальнейших геномных исследованиях отдельных приспособительных черт этого вида.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту вполне обоснованы.

Сама диссертация хорошо структурирована, включает основной текст, состоящий из 3 глав, выводов и списка литературы (216 источников, из которых 135 на иностранных языках), и четырех приложений.

В главе 1 приводится обзор литературы по предмету исследования.

Раздел 1.1 включает биологическое описание кедрового стланика, его экологию, ареал и таксономическое положение.

В разделе 1.2 приведены сведения об особенностях размножения, распространения пыльцы и семян, в **разделе 1.3** – о взаимоотношениях с родственными видами, имеющими с *P. pumila* перекрывающиеся ареалы, в том числе о гибридных процессах при контактах с *P. sibirica* и *P. parviflora*. В **разделе 1.4** обсуждаются данные о происхождении *P. pumila*. По одним данным, он является ближайшим родственником *P. koraiensis*, по другой гипотезе – продуктом гибридизации *P. sibirica* и *P. parviflora*, но по последним данным – видом, филогенетически сестринским *P. albicaulis*. Отмечается, что секция *Quinquefolia*, включающая *P. pumila*, выделилась около 50 млн. л.н. Для сосен этой группы характерен конфликт филогений, построенных на митохондриальной ДНК с одной стороны, и ядерной и пластидной ДНК с другой. Здесь необходимо сделать замечание. Следовало бы более подробно указать, что для многих групп растений с перекрестным опылением широко распространено явление расселения одного родственного вида путем опыления

другого вида и замещения его генов в гибридной популяции, путем последовательных возвратных скрещиваний. Расселение путем такого механизма происходит быстрее, чем простая колонизация путем переноса семян и сопровождается гибридным захватом митохондриальных генов аборигенного вида видом-инвадером (поскольку митохондрии не переносятся с пыльцой), что порождает, в конечном счете, конфликт филогений геномов, имеющих материнское наследование, и филогений генов, имеющих отцовское или двуродительское наследование. В этой связи конфликт в секции *Quinquifoliae* является следствием последовательных миграций из Америки в Евразию с гибридным вытеснением аборигенных видов и захватом их митохондриальной ДНК.

На стр. 29 обсуждаются направления миграции кедрового стланика. Здесь следовало привести ссылки, поскольку утверждение, что стланик проник на север Курильских островов с Камчатки, несколько противоречит результатам анализа структуры изменчивости в главе 3, где все популяции Курильских островов, а также самая южная популяция на Камчатке близки другим южным популяциям – Сахалину и Сихотэ-Алиню и заметно отличаются от других Камчатских и Чукотских популяций, что скорее соответствует миграции с Курил на юг Камчатки.

В **разделе 1.5** рассматриваются особенности хвойных видов и их преимущества в популяционно-генетических исследованиях.

В **разделе 1.6** кратко обсуждается состояние геномных исследований у хвойных видов, разработка молекулярных маркеров, их разнообразие и использование. Большое внимание уделено ядерным микросателлитам. Отмечается их высокая информативность, но при этом и трудности с кросс-амплификацией при использовании у разных видов. Автор подробно останавливается на аллозимных маркерах, их свойствах и преимуществах – возможность получения данных по одному и тому же набору локусов у разных таксонов, хорошая воспроизводимость и предположительно селективный контроль полиморфизма. В этом разделе автор также описывает предыдущие генетические исследования кедрового стланика. Они в основном носили локальный характер и затрагивали отдельные регионы. При этом восточная часть ареала кедрового стланика остается слабо изученной.

Глава 2. Материалы и методы.

В **разделе 2.1** дается описание 42 популяционных выборок, используемых в исследовании. Производит впечатление объем и географический охват проанализированного материала, включающего Восточную Сибирь и Дальний Восток. В качестве материала в основном использовались семена (зародыши и мегагаметофиты), а также вегетативные почки.

Замечание: предложение «Популяции из Прибайкалья, Забайкалья и популяция Алдан из южной Якутии, хотя и находятся в области пересечения ареалов кедрового стланика с сибирской кедровой сосной, гибридными не являются» (стр. 37) нуждается в пояснении — они не являются гибридами на основании полевых данных, генетических исследований или по литературным сведениям? Также на Рисунке 2 нет пояснения, что означает цвет популяции. Только из дальнейшего можно понять, что это основной кластер по результатам STRUCTURE. Но в этом случае следовало бы приводить не основной цвет, а представить доли каждого кластера в виде круговых диаграмм.

В разделах 2.2 – 2.5 приводится подробное описание методики аллозимного анализа с использованием электрофореза в крахмальном геле и интерпретации электрофореграмм. Раздел 2.6 содержит описание методики анализа маркера митохондриальной ДНК nad1bc. Раздел 2.7 «Методы статистического анализа» включал вычисление частот аллелей и стандартных параметров внутрипопуляционной изменчивости (H_e , H_o , N_a , F), оценки уровней подразделенности F_{st} и парных межпопуляционных значений F_{st} . Для визуализации генетических отношений использовались UPGMA и NJ кластеризация и ординация популяций с помощью метода многомерного шкалирования. Генетическую структуру *P. pumila* анализировали с помощью метода байесовской кластеризации STRUCTURE. Отпесение особей из зоны гибридизации в южной Якутии к гибридным классам на основании аллозимных генотипов проводили в программе NewHybrids. Для анализа родственных отношений по методу Wang (2011) использовали одну модельную популяцию. Для характеристики родственных отношений в группах особей в куртинах использовали метод MI.

Для анализа динамики генетической изменчивости на разных возрастных стадиях и параметров системы скрещивания, на основании наблюдаемых многолокусных генотипов зародышей от свободного опыления и материнских деревьев определяли соответствие наблюдаемого распределения генотипов теоретически ожидаемому из равновесия Харди–Вайнберга и индекс фиксации Райта и оценки доли ауткроссинга.

Для анализа географического распределения изменчивости и связи частот аллелей с климатическими параметрами использовали базу данных WorldClim.

Глава 3 Результаты и обсуждение

В разделе 3.1 **Генетическая изменчивость кедрового стланика по аллозимным локусам** приведено описание электрофоретических паттернов используемых ферментных систем. Представлены качественные фотографии электрофореграмм и их интерпретация.

Использование одновременно диплоидных тканей и гаплоидных облегчает интерпретацию электрофоретических спектров, а также позволяет напрямую выявлять «нуль-аллели». Также приведено краткое описание распространения отдельных аллелей.

Замечания:

Не понятно, почему автор игнорирует локус *Got-4*, который хотя и явно сцеплен с локусом *Got-3*, но очевидно отличается от него и может быть надежно интерпретирован.

Рисунок 3.1.8. *Mnr-1*, правое фото, первый образец слева. Интерпретация - аллель «3», на самом деле «2».

В разделе 3.2 «Анализ гибридизации кедрового стланика и сосны кедровой сибирской на юге Якутии» представлены данные об аллозимных генотипах и митохондриальных гаплотипах растений пяти популяций в районе гибридного контакта *P. pumila* и *P. sibirica* и четырех – за пределами зоны симпатрии. На основе аллозимных генотипов деревья были отнесены к чистым видам и к отдельным гибридным классам. Показано, что растения, диагностированные по морфологии как *P. pumila*, обычно не содержат примеси *P. sibirica*, деревья, морфологически определяемые как *P. sibirica*, иногда содержат примесь *P. pumila* вплоть до F1, а морфологические гибриды, если генетически гибридность подтверждается, то, как правило, оказываются F1. В сочетании с тем, что *P. sibirica* в пределах ареала *P. pumila* имеет митохондриальный гаплотип *P. pumila*, это подтверждает, что гибридизация происходит в основном путем опыления кедрового стланика пыльцой *P. sibirica* и последующих возвратных скрещиваний с *P. sibirica*, сопровождающихся постепенным сокращением доли генов *P. pumila*. Причем такая схема гибридизации являлась механизмом распространения *P. sibirica* в этой части ареала.

Замечание: Предположение, что «заимствование» мтДНК от стланика (предпочтительное выживание гибридов с мтДНК от *P. pumila*) и в последующих поколениях – бэкроссов от этих гибридов, переопыляемых пыльцой *P. sibirica*, вероятно связано с адаптацией к местным условиям» (стр. 73) считаю неверным. Более простым объяснением является способ проникновения кедра в эту область – путем опыления стланика. Этот способ оказался гораздо более быстрым, чем простое расселение семенами. В результате весь кедр здесь имеет митохондрии, унаследованные от стланика.

В разделе 3.3 «Генетическое разнообразие популяций *P. pumila* восточной части ареала» приведены оценки параметров генетической изменчивости в 22 популяциях. Не было обнаружено заметных географических трендов в уровнях изменчивости. Только в отдельных популяциях наблюдалось снижение – на острове Парамушир выявлены

минимальное число аллелей и ожидаемая гетерозиготность, что вероятно обусловлено недавним бутылочным горлышком. В этой популяции, а также в одной из камчатских популяций обнаружены генотипы, встретившиеся по несколько раз, предположительно в результате фрагментации кустов в результате внешних воздействий (оползни, лавины и т.п.). Во всех популяциях наблюдалось соотношение числа генотипов близкое к ожидаемому из соотношения Харди-Вайнберга.

3.4 Генетическая дифференциация популяций восточной части ареала

По всем полиморфным локусам обнаружена достоверные различия между популяциями в частотах аллелей. Среднее по локусам значение F_{st} было около 9%, что обычно для видов-перекрестников с обширными ареалами и большими, непрерывными популяциями.

Ожидаемо, что в исследованиях, включающих только часть ареала, F_{st} оказывалось заметно меньше. При использовании микросателлитных локусов и такого же обширного самплинга, F_{st} было несколько выше – около 13%. Анализ матриц генетических дистанций и парных значений F_{st} с помощью построения деревьев и анализа главных координат выявляет географические группы родственных популяций – 1) Камчатка с Чукоткой, 2) Юг Камчатки с Курилами, Сахалином и югом Приморья, 3) Приамурье. Более информативны результаты STRUCTURE, которые дают примерно такую же кластеризацию. Имеется следующее замечание:

Обычно результаты STRUCTURE сопровождаются графиками ΔK и $\ln P(K)$. В данном случае картина при $K=3$ мне кажется более логичной, чем при $K=4$. Кроме того при графическом представлении результатов STRUCTURE при нескольких K следует подбирать цвета кластеров такие, чтобы сохранялась преемственность кластеров при переходе между уровнями K . Обычно это достигается при использовании опции Distruct программы Clumpak. Также было бы наглядно привести доли кластеров STRUCTURE в виде круговых диаграмм на карте расположения популяций.

Ординация популяций по частотам аллелей с помощью факторного анализа выглядит более информативной, чем на основе многомерного шкалирования. Хорошо видно, что популяции образуют группы в соответствии с их географическим положением.

Автор предполагает, что наблюдаемые генетические отношения популяций есть результат истории их расселения. Высказывается гипотеза об источнике распространения стланика с северо-востока на юг – на Камчатку и в Приамурье. Однако при исследованиях структуры изменчивости бореальных и умеренных видов в качестве основного фактора её формирования обычно указывают на последний ледниковый максимум, который сокращал популяции и сдвигал ареалы в южные районы. В связи с этим в отношении

стланика было бы уместно провести реконструкцию палеоареалов, используя такие методы, как MAxENT. Возможно, это бы позволило более определенно говорить о расположении рефугиумов *P. pumila* в ледниковые эпохи и направлениях миграций. Было бы также полезно в связи с биогеографией стланика обсудить результаты исследований дальневосточных видов *Larix* и *Abies*. Так, деление камчатских выборок *P. pumila* на две группы, вероятно, соответствует результатам изучения изменчивости митохондриальной и хлоропластной ДНК лиственницы, согласно которым камчатские популяции имели происхождение в результате двух миграций – более ранней в результате миграции с Сахалина и более поздней – миграции из Восточной Сибири.

Раздел «Генетические расстояния между группами популяций» в основном повторяет результаты анализа генетических различий между популяциями и, в общем, не дает новой информации.

В разделе «Генетическая дифференциация популяций полуострова Камчатка» более подробно анализируется структура популяций Камчатки. Подтверждается их подразделенность на несколько групп, предположительно возникшая в результате нескольких независимых миграций.

В разделе «Генетическая дифференциация популяций о. Кунашир» обсуждается структура популяций на этом острове. Значительные различия, несмотря на ограниченные размеры острова, предположительно вызваны необычными условиями существования.

В разделе «Генетическая дифференциация популяций Амурской области» показана умеренная дифференциация, которая определяется не только изоляцией расстоянием, но и экологическими различиями.

Далее автор кратко резюмирует основные факторы дифференциации популяций, включая историю колонизации отдельных регионов и экологические причины. Делается предположение, что Сахалин и Курилы были заселены стлаником из континентальной области благодаря регрессии моря в ледниковые эпохи. Однако на это можно возразить следующее. Сахалин, Курилы и Японские острова представляют собой центр таксономического и генетического разнообразия хвойных благодаря мягкому, влажному морскому климату, обеспечивающему их выживание в ледниковые фазы. Например, у пихты сахалинской популяции юга Сахалина и Курил имеют повышенный уровень изменчивости по сравнению с континентальным родственным видом пихтой белокорой, что соответствует более стабильному размеру популяций хвойных в этой части ареала. Таким образом, скорее Сахалин и Хоккайдо могли быть источником колонизации хвойными видами южных Курил. А генетическое сходство южного Приморья и Курил

может быть опосредованным и связанным с ледниковыми миграциями с о. Хонсю как на север – на Сахалин и Курилы, так и в Корею и далее в Приморье.

В **разделе 3.5** обсуждаются результаты анализа родства и клоновой структуры в модельной популяции в окрестностях п. Кюбюме. При сравнении генотипов особей в одноствольных древостоях и в многоствольных куртинах показано: 1) наличие в многоствольных куртинах небольшого количества особей с совпадающим генотипом, что подтверждает возможность вегетативного размножения у стланика; 2) более близкое родство особей в многоствольных куртинах, что подтверждает гипотезу их происхождения от семян, собранных кедровкой с одного дерева. В последнем случае, однако, автор не рассматривает вариант возникновения части куртины в результате ограниченного распространения семян от отдельного дерева без участия кедровки. Это теоретически можно проверить дендрохронологическим методом, определив и сравнив возраст родственных деревьев.

Раздел 3.6 «Система скрещивания и аллозимная гетерозиготность на разных стадиях жизненного цикла» содержит результаты исследования динамики инбридинга и наблюдаемой гетерозиготности в онтогенетическом цикле стланика, путем анализа генотипов взрослых деревьев, а также генотипов зародышей и гаплотипов мегагаметофитов семян. Обнаружено значительное варьирование доли величины инбридинга, связанной с самоопылением и доли, связанной со скрещиванием между родственными особями, что может быть обусловлено историей популяций и их экологическими условиями. Если соотношение наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности у взрослых деревьев было близко к равновесному, то у зародышей семян как правило наблюдался дефицит гетерозигот. Это связано с образованием у кедрового стланика существенного количества инбредных особей, которые в дальнейшем элиминируются из популяций.

В **разделе 3.7** обсуждается географическое распределение параметров генетической изменчивости и частот отдельных аллелей.

Максимального уровня число аллелей достигает на юге Приморского края. Из этого было бы разумно сделать предположение, что важнейшие рефугиумы *P. pumila* располагались в этом районе или где-то поблизости. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности распределены более случайно.

Далее рассматриваются корреляции между географическими переменными – широтой и долготой и частотами отдельных аллелей. Разумеется, такие факторы, как история заселения современного ареала, а также случайные факторы – дрейф генов, эффект основателя, безусловно, вносят основной вклад в образование таких корреляций. А

поскольку широта и долгота сами скоррелированы с климатическими переменными, то из этого следуют и корреляций между частотами аллелей и климатическими переменными. Это значит, что для того, чтобы делать предположения о влиянии отбора на тот или иной аллель, необходимо как-то отделить эффект биогеографии от эффекта отбора, а без этого такие корреляции не имеют большого значения и не стоило их рассматривать.

В **Заключении** автор приводит наиболее важные результаты работы. Тезис, что на о-ва Кунашир и Сахалин стланик распространялся из южной континентальной части ареала, как мне кажется, не подкреплён данными, и без материала с Хоккайдо и Хонсю нельзя отвергать путь заселения из Японии.

Автореферат полностью отражает данные самой диссертации, представляя их в наиболее концентрированном виде.

Выявленные замечания носят, скорее всего, редакторский характер, не влияют на общее положительное впечатление от настоящей работы и могут быть рассмотрены в качестве пожеланий при проведении дальнейших исследований. Суммируя вышеизложенное, я считаю, что диссертационная работа «Генетическая структура популяций кедрового стланика, *Pinus pumila* (Pall.) Regel, в восточной части ареала» соответствует требованиям п.п. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями), предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор Юрий Сергеевич Белоконов заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика биологической отрасли науки.

26 февраля 2025 г.

Заведующий лабораторией
молекулярной экологии растений,

Институт экологии растений и
животных УрО РАН

620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

8(343) 2103858, semerikov@ipae.uran.ru

д.б.н. Семериков В.И.

