

ОТЗЫВ

официального оппонента Холодовой Марины Владимировны
на диссертационную работу Петра Алексеевича Казиминова
«ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ВОЛКА РОССИИ И ФАКТОРЫ ЕЁ
ФОРМИРОВАНИЯ»,

представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7. – Генетика

Актуальность темы диссертации П.А. Казиминова не вызывает сомнений как по объекту, так и по проблеме исследования. Волк (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) – широко-ареальный представитель сем. Canidae, обитающий в различных климатических зонах и экосистемах Евразии и Северной Америки, отличается высокой экологической пластичностью. Являясь наиболее эффективным крупным хищником, волк играет существенную роль в функционировании экосистем и в хозяйственной жизни человека. Волк также является одним из основных переносчиков бешенства в дикой природе. В разных частях ареала численность волка и степень изоляции отдельных популяций существенно различаются, соответственно меняются стратегии управления популяциями – от жесткого контроля до строгой охраны. Генетические исследования внутривидовой и внутрипопуляционной структуры волка имеют большое значение для выработки адекватных программ охраны и промысла.

Генетическим характеристикам волка посвящено значительное число публикаций. Большинство из них ограничено исследованиями популяций, обитающих преимущественно в странах Европы, Северной Америки. Для отдельных регионов нашей страны также получены некоторые данные по генетическому разнообразию волка. На территории России обитает основная часть видовой численности волка в Евразии, наименее подверженная антропогенному воздействию. Для отдельных регионов нашей страны также были получены некоторые данные по генетическому разнообразию волка. Однако в целом генетическая структура и разнообразие волка, обитающего на широком ареале в России и в Центральной Азии, до сих пор остаются белым пятном. Именно этой практически и теоретически значимой проблеме посвящена диссертационная работа П.А. Казиминова.

Научная новизна результатов исследования.

Диссертационная работа П.А. Казиминова отличается высокой степенью **научной новизны**. Впервые на репрезентативной выборке образцов с использованием маркеров митохондриальной ДНК и микросателлитных локусов ядерной ДНК получены данные

о генетическом разнообразии и внутривидовой структуре самой большой группировки видового населения волка Евразии, обитающей в России, а также прилегающих территорий Казахстана, выявлены факторы формирования популяционно-генетической структуры. Впервые для волка с применением микросателлитного анализа дана объективная оценка географических расстояний, на которых проявляется влияние родственных связей особей на уровень дифференциации популяций, получены данные о среднем числе мигрантов, через которых осуществляется межпопуляционный поток генов. Впервые на основании полиморфизма мтДНК дана оценка генетического разнообразия и популяционной структуры волка от Северо-Запада европейской части России до Чукотки.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Характеристика внутривидовой структуры и генетического разнообразия волка, сочетающего стайный образ жизни, филопатрию с масштабными дистанциями расселения отдельных особей, полученная для самой крупной евразийской группировки вида с наименее выраженным антропогенным прессом, имеет существенное **теоретическое значение** для расширения знаний в области популяционной генетики и филогеографии высокоомобильных широко-ареальных видов. Результаты работы также могут внести вклад в уточнение таксономической структуры *Canis lupus*.

Результаты работы П.А. Казиминова о популяционной структуре и внутривидовом разнообразии безусловно имеют большое **практическое значение** для научно-обоснованного планирования мероприятий по контролю численности волка на разных уровнях – от регионального до федерального, без угрозы генетического обеднения отдельных группировок. Включение полученных автором новых последовательностей фрагментов мтДНК волка в международную базу GenBank (NCBI) позволяет использовать их другими исследователями. Примененный автором комплекс методов по выявлению гибридов волка с домашней собакой и шакалом, в последние годы расширяющим свой ареал, может применяться и другими группами исследователей. Межвидовая гибридизация имеет негативные последствия, изменяя поведение волков-метисов, делая их более опасными для человека. Существенное практическое значение для дальнейшего использования научными коллективами имеет созданный автором на основе собственного опыта пакет для среды R, в котором в удобном для пользователей формате функций и алгоритмов, могут обрабатываться данные микросателлитного анализа. Результаты диссертационной работы П.А.

Казими́рова могут быть включены в лекционные и практические курсы по популяционной генетике для студентов биологических ВУЗов.

Диссертация изложена на 147 страницах. Работа построена по классической схеме, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Рукопись содержит 16 рисунков, семь таблиц. Список литературы включает 204 публикации, из них 31 — на русском языке.

Результаты работы представлены в пяти научных публикациях в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК для защиты диссертаций, а также в девяти тезисах и статьях в сборниках научных конференций.

Достоверность полученных результатов. Диссертационная работа П.А. Казими́рова выполнена на высоком профессиональном уровне с использованием современных молекулярно-генетических и статистических методов. Все основные результаты исследования опубликованы в ведущих изданиях и представлены на многочисленных отечественных и международных научных конференциях. Результаты исследования являются достоверными, а выводы обоснованными.

Во **«Введении»** обоснована актуальность выбранной темы и охарактеризована степень ее разработанности, четко сформулированы цель и задачи исследования, даны описания научной новизны, теоретической и практической значимости работы, представлены выносимые на защиту положения, приведены сведения об апробации полученных результатов, публикаций по теме исследования, указан личный вклад автора в исследование и благодарности.

Глава 1 «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ» включает пять разделов, в которых рассматриваются публикации по эволюционной истории волка, его биологии, внутривидовой систематике, популяционно-генетическим исследованиям волка в России, а также вопросам гибридизации с другими представителями рода *Canis*. Обзор очень подробный, написан вполне профессионально, читается с интересом. Обзор литературы отражает широкую эрудицию П.А. Казими́рова как в вопросах филогении и популяционно-генетических исследований волка, так и в различных аспектах экологии этого вида. Важно, что при рассмотрении различных публикаций автор отмечает еще не ясные вопросы, которым посвящена диссертация.

Глава 2 «Материалы и методы» отражает огромную работу, проведенную автором для решения поставленных задач. Работа основана на обработке чрезвычайно объемного материала - 878 образцов от животных, добытых в 48 регионах России и Республики Казахстан. Приводится карта сбора образцов. Подробно описаны все лабораторные процедуры по анализу микросателлитов, фрагмента контрольного региона (D-петли) мтДНК, а также маркеров Y-хромосомы, цитохрома *b* мтДНК и рестриктазного анализа двух однонуклеотидных полиморфизмов в генах *ADCY8* и *RYR3*, использованных для определения гибридов. Отмечу, что для выявления гибридов кроме генетических методов автор дополнительно использовал и краниометрический анализ. Высокой оценки заслуживает не только детальное описание каждого метода и способов статистической обработки данных, но и последовательность изложения разных методических подходов, необходимых для решения поставленных задач. Например, анализу популяционной дифференциации предшествует раздел с описанием методов определения влияния семейной структуры на генетическую структуру популяций и разработки критериев исключения родственных особей. Прозрачно, четко и аргументированно для каждого этапа работы дано описание выбора образцов и микросателлитных локусов. Существенное значение имеет то, что комбинированный анализ микросателлитных и митохондриальных маркеров проведен на одних и тех же образцах. Большой интерес представляет описание анализа влияния антропогенных и географических факторов на популяционную динамику волка. Сравнительный анализ черепов проведен современным методом геометрической морфометрии. Отличное впечатление производит широкий арсенал методов статистической обработки данных, их подробное описание и выбор наиболее оптимальных.

Глава 3 «Результаты» включает шесть разделов, в которых последовательно представлены результаты диссертационной работы.

Самый большой раздел главы посвящен анализу микросателлитных локусов. В нем приводится характеристика генотипов, дается оценка влияния близкородственных особей на популяционно-генетическую структуру и анализ популяционно-генетической структуры. Автор очень серьезно подошел к оценке пригодности образцов и микросателлитных локусов для генотипирования, в итоге чего были получены генотипы для 829 особей по 20 локусам. Высокой оценки заслуживает аргументированный выбор программ, генетических показателей и индексов, наиболее

адекватно оценивающих популяционно-генетическую структуру вида, что само по себе является важным результатом работы. Такой подход позволил П.А. Казмирову получить достоверные результаты. Например, несколько разных индексов автор использовал для уточнения оценки географических дистанций, на которых сохраняется влияние родственных отношений особей на дифференциацию популяций, установив максимальное проявление на расстоянии примерно до 100 км. Результаты кластеризации генотипов анализировались на двух наборах образцов – полного и сокращенного, из которого были исключены близкородственные особи, что позволило более строго оценить межпопуляционные дистанции, установить среднее число мигрантов на поколение. Итоговый анализ популяционно-генетической структуры (688 особей и 19 локусов) позволил автору выявить пространственное разделение популяций волка при значениях K (числа выделенных кластеров) от 2 до 7, установить характер их связи с конкретными территориями и экологическими зонами, выявить оптимальное число кластеров 4 – 5. Для каждого кластера получены значения показателей внутривидовой изменчивости, рассчитанные по полному и сокращённому наборам генотипов (табл. 2, с.63). Результаты показали достаточно высокий уровень генетического разнообразия (наблюдаемая гетерозиготность 0.65-0.70, ожидаемая 0.65 – 0.80), и незначительные различия между двумя наборами. Интересно, что включение плотности лесного покрова в анализ отнесения к генетическим кластерам не привело к значимому изменению полученных результатов. Полученные результаты были экстраполированы на всю территорию России. При этом автор отмечает определённую долю условности экстраполяции результатов кластерного анализа на территории, для которых отсутствуют пробы, что свидетельствует о профессиональной зрелости П.А. Казмирова. Индекс Гарзы – Вильямсона, отражающий стабильность популяций, имел высокие значения как при анализе на макро-масштабе, так и при рассмотрении локальных популяций.

Во втором разделе подробно описаны результаты анализа полиморфизма контрольного региона мтДНК для 293 образцов, показавшие высокий уровень генетического разнообразия волка на территории России. Даже для короткого (314 п.н.) фрагмента было описано 83 гаплотипа, установлены высокие значения нуклеотидного и гаплотипического разнообразия. Отмечу, значительную долю трансверсий по отношению к транзициям (26/42) в общем выравнивании, свидетельствующую о длительной эволюционной истории волка. В европейской популяции генетическое разнообразие было ниже, чем в других региональных группировках волка. В ней также наблюдались признаки снижения численности – положительное значение индекса

Таджимы. Для остальных популяций наблюдались отрицательные значения, указывающие на рост численности. Дифференциация между географическими популяциями хотя и была статистически значимой, но на нее приходилось менее 4 % от общей генетической изменчивости. Очень интересно, что распределение гаплотипов и гаплогрупп мтДНК на исследованной территории России демонстрировало клинальный характер (рис. 11 с. 82.).

В третьем разделе, представлены результаты комбинированного анализа микросателлитных и митохондриальных маркеров, полученных для одних и тех же особей ($n = 198$). Для пяти выделенных ранее кластеров установлена более высокая доля межпопуляционной дифференциации по микросателлитным локусам (6.38 %), чем по мтДНК (2.55 %), а также сходная картина клинальной изменчивости.

В четвертом разделе главы для микросателлитных данных проведен анализ влияния антропогенных и географических факторов на популяционную динамику волка. Описаны результаты, полученные с использованием разных статистических методов и индексов, комбинация которых позволила установить слабую достоверную корреляцию между генетическими дистанциями и затратностью перемещения животных.

Отдельный раздел главы посвящен выявлению возможного гибридного происхождения **особей** волка с необычным фенотипом. Используются разные молекулярные маркеры ядерной и митохондриальной ДНК, а также методы сравнительной морфометрии черепов волка, шакала и собаки. По результатам анализа маркеров мтДНК и Y-хромосомы не было выявлено гибридов первого поколения. По результатам анализа микросателлитных маркеров яДНК был идентифицирован один предположительный гибрид второго поколения волка с шакалом, что позволило предположить наличие потока генов между популяциями шакала и волка в южных регионах европейской части России. Результаты как генетического, так и краниологического исследований, позволили предполагать гибридизацию волков с собаками в этом регионе.

В последнем разделе главы приводится описание созданного автором на основании собственного опыта пакета для среды R, в котором в удобном для пользователей формате собраны функции и алгоритмы обработки генетических данных.

Глава 4 «Обсуждение» очень интересная, раскрывает глубокое знание автором не только генетических, но и экологических характеристик объекта исследования.

Широко используются литературные данные по различным характеристикам различных популяций волка. Подчеркивается необходимость учитывать влияние семейной и пространственной организации на генетическую структуру популяций волка. Обосновываются дистанции от центра популяций с разной степенью проявления родственных отношений: 125-150 км включают семейные группировки, и потомков, расселяющихся вблизи мест рождения (натальную филопатрию); на расстоянии 150-500 км влияние семейной структуры значительно снижается, но остаётся заметным вплоть до удаления примерно на 1600 км. Такой подход автор считает разумным компромиссом между сохранением информации о расселяющихся на большие расстояния особях и снижением эффекта неслучайного отбора проб.

Хотя в работе П.А. Казиминова обнаружена достоверная дифференциация географических популяций, по микросателлитным локусам и мтДНК, доля межпопуляционных различий в общей генетической изменчивости невелика (4-5%). Это позволило автору сделать вывод о том, что видовое население волка России и Казахстана представляет собой относительно непрерывную структуру, не разделённую существенными барьерами. Наиболее выраженным препятствием, по мнению автора, является Чукотское нагорье, изолирующее чукотскую популяцию от сибирской. Подробно, с разбором экологических условий, размеров, степени изоляции, обсуждаются сходство и различие межпопуляционных генетических дистанций, полученные автором, с данными других исследователей для разных популяций волка, обитающих в Европе, Северной Америке и других частях видового ареала.

Значительный интерес представляет обсуждение распределения волков из разных региональных группировок по выделенным при анализе микросателлитных локусов кластерам, их связь с разными экологическими зонами. Семь кластеров ($K=7$) отражают основные эко-географические группы внутри ареала волка на исследуемой территории.

Заслуживают внимания предположения автора о роли Урала, в качестве буфера между восточным и западным генетическими кластерами, а также о том, что популяции Алтая могли служить донорскими для пострадавших при освоении целины популяций волка Казахстана. В данной работе не удалось выделить хорошо дифференцированные группы, которые бы соответствовали выделяемым на исследованной территории подвидам волка. Кстати эта закономерность наблюдается и у других крупных млекопитающих России, например бурого медведя и лося.

Сравнение с другими популяциями волка показало высокий уровень генетического разнообразия волка России и Казахстана в целом и ее отдельных

региональных группировок. Все группировки находятся в стабильном состоянии. Несколько сниженные показатели генетического разнообразия волков из Европейской части России и Казахстана, а также признаки, указывающие на тенденцию к снижению численности, автор объясняет более сильным влиянием антропогенного пресса по сравнению с другими региональными группировками.

Обсуждая результаты анализа влияния антропогенных и географических факторов на популяционную структуру волка, автор справедливо отмечает достаточную примитивность и ограниченность использованной модели, основанной преимущественно на заимствовании значений сопротивления из литературных источников, а также недостаток конкретных данных для ее улучшения. Однако использование даже такой простой модели позволило показать определённую, хотя и незначительную степень влияния антропогенного воздействия и характеристики рельефа на динамику популяционной структуры волка на исследуемой территории. Для исследованной наиболее крупной группировки волка влияние характеристик рельефа и антропогенный пресс не является основной движущей силой, формирующей популяционную структуру.

При обсуждении проблемы выявления гибридных особей среди представленных автору образцов, П.А. Казимиров высказывает интересное предположение о том, что популяция бродячих собак, особенно многочисленная в южных регионах России, может служить «посредником» для потока генов между волком и шакалом, возможность гибридизации которых до сих пор достоверно не подтверждена в научной литературе. Автор отмечает необходимость анализа расширенной выборки по всем трём потенциальным участникам гибридизации р. *Canis*.

В данной главе не только обсуждаются полученные результаты, но и выявляются перспективные направления для дальнейшего изучения генетической структуры и разнообразия волка России и сопредельных стран, что заслуживает высокой оценки.

В заключении подводятся итог проведенного исследования.

Приложение содержит дополнительную информацию по описанию использованного материала.

Диссертационная работа П.А. Казимирова производит очень благоприятное впечатление. Результаты работы получены на чрезвычайно большом объеме материала, использованы молекулярные маркеры ядерной и митохондриальной ДНК, применен

широкий спектр современных статистических методов обработки. Обзор литературы и обсуждение показывают широкую эрудицию автора. Выводы и положения, выносимые на защиту, соответствуют цели и поставленным задачам, обоснованы в результатах работы и их обсуждении. Автореферат отражает основные результаты работы и их обсуждения. Диссертация написана хорошим литературным языком, практически не содержит опечаток.

Отдельно отмечу, что во всех главах диссертации ярко проявляется явный интерес автора к объекту исследований – волку. Этим в значительной степени объясняется успех данного исследования.

Однако к работе есть некоторые замечания и вопросы.

1. Что обозначает показатель N в таблицах 2 (с.63-64) и 5 (с.73-74)?
2. В таблицах 2 (с. 63-64) и 5 (с. 72-73) во всех выделенных кластерах ожидаемая (He) гетерозиготность существенно выше наблюдаемой (Ho). Чем можно объяснить этот факт?
3. К рисунку 9 (с.80): на филогенетическом дереве для гаплотипов мтДНК, описанных автором, следовало бы добавить подписи клад (гаплогрупп), обозначить цветами/символами принадлежность гаплотипов к выделенным региональным группам.
4. Следовало бы отдельно, только для гаплотипов мтДНК из России и Казахстана, построить медианную сеть (в программе Network или любой подобной), отражающую филогенетические отношения между гаплотипами, число образцов в каждом гаплотипе, с обозначением цветом доли региональной принадлежности образцов в каждом гаплотипе, числа мутаций на ветвях. Обычно медианные деревья строятся для описания именно внутривидовых филогенетических отношений.
5. На медианной сети гаплотипов (рисунок 10, с.82), включающей кроме *C. lupus* еще три вида р. *Canis*, следовало бы в подписи к рисунку указать названия выделенных гаплогрупп.

Все высказанные замечания носят редакторский характер и не влияют на общую высокую оценку диссертации.

