

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по науке Федерального
государственного автономного
образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Уральский
федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н.Ельцина»,
к. ф.- м. н., с.н.с.

В.В.Кружаев
2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Волковой Полины Андреевны "Использование молекулярно-генетических данных для анализа миграционных путей сосудистых растений в Восточной Европе в позднеледниковье", представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности:
03.02.01 – «Ботаника»

Диссертация посвящена интересной научной проблеме установления вероятных рефугиумов во время последнего покровного оледенения и путей расселения растений в постледниковье (последние 20 тыс. лет). В качестве модельных объектов выбраны *Erythronium dens-canis*, *E. caucasicum*, *Primula vulgaris* s.l., *Helianthemum nummularium* s.l., aggr. *Carex salina*, *Picea obovata*, *P. abies* (а также промежуточные популяции между последними). В исследовании использованы как традиционные морфологические, биометрические, фенетические, так вполне современные методы ДНК-анализа. Данное исследование представляется актуальным, прежде всего, в теоретическом отношении, для понимания процессов филогенеза, флорогенеза и социогенеза в Европе и на Кавказе. В практическом смысле, это исследование может оказаться полезным для организации охраны некоторых, ценных в научном отношении, популяций, при написании новых изданий региональных Красных книг и т.п.

Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключительного раздела «8 –Основные закономерности миграции сосудистых растений в Восточной Европе и на сопредельных территориях в позднеледниковье» (в котором коротко подводятся итоги исследования и обсуждаются полученные результаты), выводов, раздела «Благодарности», списка литературы (314 наименований, из них 257 на иностранных языках) и 8 приложений; изложена на 226 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, 24 рисунка.

Соискательницей поставлены цели: 1) *методическая* – оценить эффективность использования молекулярно-генетических данных для изучения миграционных путей сосудистых растений и 2) *теоретическая* – установить возможные рефугиумы сохранения некоторых видов во время последнего максимума оледенения (около 20 тыс. лет назад) и

пути их расселения во время последующего потепления.

В соответствии с этими целями были поставлены 6 основных задач, включавших изучение: генетической структуры модельных видов на значительной части их ареалов, в том числе периферических популяций, установление вероятных рефугиумов, миграционных путей в постледниковье, оценку таких экологических факторов как градиент континентальности и экологический барьер Причерноморских степей; исследование генетического полиморфизма в зонах интрогрессии.

В рассматриваемой диссертации Полина Андреевна Волкова защищает 5 положений: 1) об эффективности молекулярно-генетических маркеров для решения поставленных задач; 2) преобладании миграций растений в Восточной Европе в постледниковье в восточном и северном направлении; 3) барьерном эффекте степных территорий и градиента возрастания континентальности для мезофитных видов; 4) о значительной роли некоторых северных (внесредиземноморских) рефугиумов в формировании современной флоры Восточной Европы; 5) о влиянии периодических покровных оледенений на генетическое разнообразие северных популяций некоторых видов как в сторону резкого понижения (вследствие эффектов «основателя» или «бутылочного горлышка», так увеличения разнообразия, вследствие наложения миграционных потоков.

Поставленная цель и задачи исследования, в основном, не вызывают возражений. Относительно 4-го защищаемого положения следует отметить, что влияние фактора континентальности на распространение мезофитных видов хорошо изучено и его, скорее всего, не следовало выносить на защиту.

Ниже дадим краткое обсуждение содержания диссертации.

В главе 1 «Фитогеографические исследования: методы, подходы и состояние изученности Восточной Европы» дается (1.1.) короткая справка (литературный обзор) о климатических флуктуациях в плейстоцене в Европе; методах исследования динамики ареалов (1.2), в том числе, классического флорогеографического анализа (Попов, 1963; Толмачёв, 1986; Камелин и др., 1999 и т.д.), филогеографических исследований (Schaal et al., 1998; Tollesfrud et al., 2008; Buchovska et al., 2013 и т.д.); анализируются (1.3) достоинства и недостатки некоторых молекулярно-генетических методов, применяемых в филогеографии; рассматриваются (1.4) экологические факторы, влияющие на ареалы видов и их генетическое разнообразие; приводятся (1.5) примеры по ряду филогеографических реконструкций миграционных путей в Европе. Представленная справка (стр. 10-31) вполне исчерпывающей по данной теме.

В главе 2 «Использованные модельные объекты» даётся краткая информация об модельных видах, их распространении, полиморфизме, внутривидовых таксонах, дискуссионных моментах таксономии.

Справка по используемой методике исследования вполне достаточна и не избыточна.

В главе 3 «Материалы и методы» дается информация об общем числе, локализации отобранных проб и краткое изложение использованных методов исследования.

В общей сложности было собраны образцы для молекулярно-генетических исследований из 126 природных популяций *Primula vulgaris* s.l., 52 популяций *Erythronium dens-canis*, 4 популяций *E. caucasicum*, 85 популяций *Helianthemum nummularium* s.l., 28 популяций (92 образца) aggr. *Carex salina*; 16 популяций (образцы с 177 деревьев) *Picea abies*, *Picea obovate* и вероятных переходных форм. Также собирался материал для биометрических исследований.

Использовались как традиционные методы фенетического анализа (изменчивости окраски цветков), биометрического анализа, так и ДНК-анализ (AFLP-анализ и ITS-анализ, ядерной ДНК, некоторых полиморфных участков хлоропластной и митохондриальной ДНК). Дана краткая информация об использованных методах исследования и приёмах статистической обработки.

Выбор методов ДНК-анализа (с учётом неизбежных финансовых и материальных ограничений) представляется вполне удачным, возможно, за исключением анализа хлоропластной и митохондриальной ДНК, использованного для исследования интрогрессивной гибридизации видов рода *Picea*. Статистическая обработка данных выполнена корректно.

В главе 4 «История формирования ареалов кавказских видов *Erythronium*» изложены результаты генетического исследования европейских и кавказских кандыков по изменчивости фрагментов хлоропластной ДНК *rpl32-trnL* и *rps15-ycfl*. Показано наличие видоспецифичных хлоротипов (свойственных только *E. dens-canis* или *E. caucasicum*) Кроме того, установлено, что все исследованные популяции из Трансильвании (Среднедунайской низменности) отличаются оригинальным хлоротипом. При этом трансильванский фрагмент ареала *E. dens-canis* отличается достоверно более высоким полиморфизмом (фрагментов ДНК *rpl32-trnL* и *rps15-ycfl*) по сравнению со всей остальной частью ареала. Дифференциацию исследованных кандыков на три географические группы П.А. Волкова рассматривает как доказательство существования позднеледниковых рефугиумов кандыков в Восточном Причерноморье, в Среднедунайской равнине и (возможно) в Южной Европе. Достаточно хорошее обособление кавказского кандыка от европейского *E. dens-canis* ей объясняется барьерным эффектом причерноморских степей. причём начало такого обособления она относит к весьма отдалённому периоду – до начала плейстоцена. Результаты, полученные при исследовании европейских и кавказских кандыков, несомненно, интересны, однако их интерпретация представляется не безупречной. Как признаёт сама П.А. Волкова, наблюдаемое отличие между трансильванскими и «не трансильванскими» группами популяций *Erythronium dens-canis* вполне могло возникнуть в процессе расширения ареала в течение последних 20 тыс. лет. Поэтому совершенно излишне предполагать несоразмерно большое время, которое было необходимо для появления аналогичного генетического различия *E. caucasicum*. Если степи Северного Причерноморья и являются непреодолимым препятствием для миграции этого вида, то нет веских причин отрицать, что сплошной ареал *Erythronium dens-canis* мог относительно недавно смыкаться с ареалом *E. caucasicum* по

южному побережью Чёрного моря, например, во время Микулинского межледниковья (около 100 тыс. лет назад), когда климат был более тёплым и влажным, а различные варианты мезофитных сообществ были распространены заметно шире, чем в настоящее время.

В главе 5 «Роль рефугиумов Понто-Каспийского региона в формировании генетического разнообразия других районов Европы: филогеография *Primula vulgaris*» излагаются результаты фенетического и филогеографического исследования полиморфного *Primula vulgaris* s.l. Это исследование отличается от предыдущего примечательной комплексностью, поскольку не ограничилось рассмотрением полиморфизма соответствующих участков хлоропластной ДНК, но также включало ITS-анализ ядерной ДНК и фенетический анализ изменчивости окраски цветка. Это трудоёмкое исследование, несомненно, вполне успешно выполнено, а статистическая обработка результатов проведена корректно. При этом выявлена сложная мозаика распространения хлоротипов и ITS-гаплотипов.

Полученные результаты интересны, несомненно, полезны для понимания процесса эволюции и миграции этого вида.

Тем не менее, интерпретация полученных данных и выводы, приводимые в диссертации, опять же не безупречны. С одной стороны (стр. 95) предполагается, что *Primula vulgaris* могла проникать с северо-восточного побережья Чёрного моря на Среднедунайскую низменность *через Причерноморские степи* во время одного из ближайших межледниковий (надо полагать и в другие периоды потеплений), с другой стороны, вновь утверждается, что степные участки были существенным барьером миграций. По нашему мнению, в условиях резкой неустойчивости климата плейстоцена практически любой экологический барьер был эфемерным, что и демонстрирует ареал *Primula vulgaris* s.l., отдельные популяции и островные эксклавы которого отмечаются в Скандинавии и центральной части Европейской России. Даже если степи и были заметным барьером, ареал *Primula vulgaris* s.l., который и в настоящее время практически непрерывно окаймляет южное побережье Чёрного моря, предполагает почти регулярный поток генов по южному пути, если не в голоцене, то хотя бы в Микулинское межледниковье (т.е. лишь 100-80 тыс. лет назад). На наш взгляд, более значимыми факторами для обособления популяций *Primula vulgaris* s.l. могли быть не степи (или другие, чуждые экологии вида сообщества), а регулярная инсуляризация во время многократных оледенений Валдайской эпохи, изоляция расстоянием и долговременными экологическими факторами, такими как высокогорные участки хребтов, обширные водоёмы (например, Чёрное море) или геохимический состав подстилающих пород (например, массивные известняковые обнажения Крыма и Западного Кавказа).

На основании отсутствия корреляции между признаками окраски цветка и молекулярно-генетическими маркерами П.А. Волкова делает вывод, что разделение *Primula vulgaris* s.l. на ряд «мелких видов» (исключая *P. heterochroma* Stapf) следует отвергнуть. По всей видимости, с этим выводом следует согласиться. Однако, необходимо обратить внимание, что выбранные молекулярно-генетические методы вполне эффективны для

выполнения основных поставленных задач диссертации, но не вполне адекватны для доказательства самостоятельности того или иного вида. Следует учитывать, что оценивается полиморфизм «бессмысленных» (нейтральных) участков ДНК, который «не замечается» естественным отбором, а следовательно достаточно обособлен от процесса видообразования. Постепенное изменение нейтральных участков ДНК используется лишь как инструмент (не всегда надёжный!) примерной оценки времени и глубины обособления популяций друг от друга. При этом, давно обособленная популяция может иметь по хлоротипам и ITS-маркерам различия, соизмеримые с видовыми, при полном отсутствии морфологических особенностей (Кривенко и др., 2014; Кривенко, 2015) и, наоборот, надёжно отличающиеся виды не могут быть уверенно разделены по тем же маркерам (многочисленные случаи, в том числе, примеры, приводимые автором данного труда).

В главе 6. «Филогеография *Helianthemum nummularium* и роль рельефа в формировании миграционных путей» излагаются результаты исследования высокополиморфного *Helianthemum nummularium* s.l.

Исследование проведено исключительно на основании анализа изменчивости фрагмента *rps16-trnK*. хлоропластной ДНК.

Следует высказать сожаление, что в анализ не были включены наиболее восточные (единственные азиатские местонахождения не только этого вида но и рода в целом), популяции *Helianthemum nummularium* s.l. с восточного склона Северного и Среднего Урала и, особенно ценные в научном отношении, резко изолированные популяции на р. Белая Кедва (бассейн системы левых притоков р. Печора – доступные для исследования свежие гербарные сборы есть в SYKO и LE). По всей видимости, П.А. Волкова даже не подозревает о существовании этих интересных в научном отношении популяций, поскольку они вообще не обозначены на карте (рис. 16). Сведения об этих местонахождениях имеются в сводке Флора Восточной Европы, т. 9 (1996) и в, доступных в интернете, региональных Красных книгах.

Анализ выявил довольно хорошее разделение на три географические группы, никак не коррелирующие с принятым в классической систематике делением *Helianthemum nummularium* s.l. на «микровиды»: 1) балканско-кавказско-приуральскую; 2) среднеевропейскую; 3) все остальные, преимущественно восточно-европейские популяции.

П.А. Волкова рассматривает балканские популяции как исходные (базальные). Из Балкан *Helianthemum nummularium* s.l., по её мнению, мог распространиться на Кавказ вдоль южного берега Чёрного моря (примечательно, что этот путь миграции игнорировался соискательницей для *Primula veris* s.l. и *Erythronium* ssp.), а затем проник к северу от Кавказа вплоть до Южного Урала. Наиболее распространённые носители гаплотипа «С», по мнению П.А. Волковой также могут иметь кавказское происхождение, причем распространение этого гаплотипа произошло очень быстро, возможно в результате миграции вслед за отступающим ледником (20-13-тыс. лет назад?). На наш взгляд эта гипотеза выглядит вполне правдоподобно и должна учитываться как рабочая при последующих исследованиях *Helianthemum* ssp и экологически близких видов.

Мнение соискательницы о неправомерности выделения «мелких видов» в пределах полиморфного *Helianthemum nummularium* s.l. мы вполне поддерживаем, но, как уже отмечали выше, использованные методы не вполне подходят для однозначных выводов о самостоятельности таксонов.

В главе 7. «Гибридные зоны, образовавшиеся вследствие заселения разными эволюционными линиями подвергавшихся оледенениям территорий (на примере Северной Карелии и юга Мурманской области)» излагаются результаты исследования зон интрогрессии двух близких видов *Picea* и географических рас агрегата *Carex salina* (*C. salina*, *C. paleacea*, *C. subspathacea*, *C. recta*, *C. halophila*) и *Carex aquatilis*.

Для исследования агрегата *Carex salina*, использовался анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ядерной ДНК (amplified fragments length polymorphism – AFLP), а также классический морфологический метод сравнения. Для исследования интрогрессии видов *Picea* применён анализ изменчивости некоторых участков хлоропластной ДНК –: хлоротипов (наследование по отцовской линии) и митохондриальных гаплотипов (наследование по материнской линии), а также классический биометрический метод сравнения. Выбор метода AFLP-анализа для исследования осок представляется вполне удачным, тогда как для диплоидных видов рода *Picea*, на наш взгляд, более чёткие результаты могли быть получены при использовании аллозимного анализа (он по-прежнему эффективен для исследования интрогрессии диплоидных, хотя и давно «вышел из моды») или того же AFLP-анализа.

Исследования осок секции *Phacocystis* s.l. выявили сложную систему интрогрессии, в которой участвуют как «чистые» виды *Carex aquatilis*, *C. subspathacea*, *C. paleacea* так и их гибридные производные. Данные, полученные на основании традиционного морфологического сравнения хорошо коррелировали с данными AFLP-анализа. У нас нет сомнения, что данное исследование позволило установить сложную картину гибридного взаимодействия осок секции *Phacocystis* s.l. в Карелии и Мурманской области, но нет уверенности, что этот результат не мог быть получен простым фенетическим или морфологическим анализом, без применения дорогостоящего молекулярно-генетического анализа. Впрочем, следует признать, что одна из заявленных целей исследования тем самым выполнена – показано, что подобные маркеры вполне эффективны для решения подобных задач.

Относительно исследования близких видов рода *Picea* и их гибридного взаимодействия полученные результаты весьма не однозначны. Анализ морфологических признаков не позволил уверенно отличить ель из Карелии и Мурманской области от типичной *Picea obovata* (на морфологическом уровне гипотеза об интрогрессии с европейской *Picea abies* в этом районе должна быть отвергнута; см. рис. 22), тогда как результаты исследования по изменчивости хлоротипов и митохондриальных гаплотипов можно трактовать как результат интрогрессии. Однако, как мы отмечали в замечаниях по главам 4-6 «бессмысленные» (нейтральные) участки оргanelльной ДНК используемые в подобных

исследованиях часто никак не коррелируют с принадлежностью к какому либо виду, а поэтому не вполне адекватны при решении подобных задач. На наш взгляд, соискательнице не удалось однозначно продемонстрировать явление интрогрессии между *Picea abies* и *Picea obovate* в Карелии (вопреки содержащемуся в этой главе выводу).

Соответствие **Выводов** поставленным задачам и полученным результатам.

Выводы соответствуют поставленным задачам, но не всегда вытекают из полученных результатов, иногда неявно противоречат друг другу. Преимущественная постледниковая миграция в северном и западном направлении (вывод 2), по всей видимости, действительно продемонстрирована на модельных объектах, но нельзя этот результат экстраполировать на большинство видов флоры Восточной Европы (это очевидно из традиционных флорогенетических реконструкций, например Горчаковский, 1969; Камелин и др., 1999 и др.). На наш взгляд, П.А. Волковой всё таки не удалось показать роль Причерноморской степи как существенного барьера миграции и обмена генотипами между западнокавказскими и балканскими-трансильванскими популяциями исследованных видов (вывод 6). Очевидно, что существовала возможность миграции и обмена генотипами вдоль южного побережья Чёрного моря – в соответствующих рассуждениях П.А. Волковой эта альтернатива обычно (кроме *Helianthemum nummularium* s.l.) не рассматривалась. Вывод 11 (агрегат *Carex salina* следует рассматривать как один биологический вид гибридной природы), представляется преждевременным, поскольку основывается на исследованиях небольшого фрагмента этого циркумполярного таксона. Более того, если это и в самом деле было так (т.е. aggr. *Carex salina* представлял высокополиморфный сингамеон по всему циркумполярному ареалу), то вывод 4 «*расселение растений на освободившиеся от ледникового покрова территории сопровождалось повышением генетического разнообразия...*», продемонстрированный на данном примере, следовало признать ошибочным.

Тем не менее, многие из замечаний во многом носят дискуссионный характер и не существенны для оценки рецензируемой работы как добротного научного исследования, они не снижают научной ценности работы, объективности большинства выводов.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования.

Результаты исследований могут быть использованы в учебном процессе, прежде всего в ВУЗах, при чтении курсов по филогеографии растений. Полученные результаты также целесообразно использовать при составлении Красных книг и планировании и проведении практических мероприятиях по охране исследованных видов на федеральном и региональном уровнях.

Автореферат отражает структуру и содержание диссертации. В *Списке работ...* автореферата приводятся: 1 монография, 22 статьи в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК, 8 тезисов. Однако, следует отметить, что вполне соответствуют теме диссертации 9 статей (все в авторитетных зарубежных журналах) и 7 тезисов (из них 6 опубликованы на английском языке, преимущественно на различных зарубежных конференциях). Результаты исследования обсуждались на всероссийских и авторитетных

международных научных конференциях.

Заключение. Диссертационная работа "Использование молекулярно-генетических данных для анализа миграционных путей сосудистых растений в Восточной Европе в похлестниковье" является законченным научным исследованием на актуальную тему. Диссертационная работа вносит существенный вклад в понимание процессов филогенеза и флорогенеза в Восточной Европе в похлестниковье. Работа соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней» (пп.9-14) утверждённых постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемых к диссертациям на соискание учёных степеней доктора биологических наук, а её автор – Полина Андреевна Волкова заслуживает присуждения ей учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.01. – «Ботаника».

Отзыв заслушан и утверждён на заседании кафедры ботаники Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина» 30 сентября 2015 г., протокол № 11.

Князев Михаил Сергеевич

к.б.н., доцент кафедры ботаники
e-mail: knyasev_botgard@mail.ru

Мухин Виктор Андреевич

Заведующий кафедрой ботаники
заслуженный деятель науки РФ,
д.б.н., профессор
e-mail: V.A.Mukhin@urfu.ru



Сведения о ведущей организации:

Полное название: Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н.Ельцина»

Сокращённое название: УрФУ

Адрес: 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19

телефон: +7 (343) 375-45-07

e-mail: rector@urfu.ru