

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Саломашкиной Валентины Валерьевны **«Внутривидовая структура бурого
медведя (*Ursus arctos*) России и сопредельных стран по данным
полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК»**,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.12 - зоология

Диссертационная работа В.В. Саломашкиной посвящена анализу внутривидовой генетической изменчивости бурого медведя, *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 - крупного хищника, широко распространённого в России, по данным полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК. Профиль этой диссертации соответствует специальности «зоология», поскольку, несмотря на использованные современные генетические методы, решаются в основном зоологические и зоогеографические задачи, связанные с внутривидовой систематикой и популяционно-генетической структурой вида, важного в экологическом отношении. Актуальность темы несомненна в фундаментальном плане, поскольку исследование позволит расширить существующие представления об эволюционной истории, филогеографии и состоянии генофонда крупного хищного млекопитающего на примере бурого медведя. На территории России обитает самая большая по площади часть ареала вида, на которой наблюдается относительно высокая численность, так что её можно рассматривать как ядро голарктической макропопуляции медведя. Новизна исследования заключается в широком охвате сборами образцов видового ареала и использовании для анализа генетической структуры нескольких классов молекулярно-генетических маркеров с разным типом наследования. Распространение гаплогрупп мтДНК и Y-хромосом объекта исследования на территории РФ крайне слабо изучены (особенно это касается Кавказа, Урала, Сибири, Центральной Азии и в значительной степени Дальнего Востока), а систематические данные о полиморфизме аутомных микросателлитных локусов практически отсутствуют. Использование в работе репрезентативного

материала, сравнение полученных данных по разным классам маркеров в едином обсуждении и предложенные автором реконструкции эволюционных сценариев являются приоритетными.

Диссертационная работа построена по традиционному плану, состоит из Введения, глав 1 - Обзор литературы, 2 – Материалы и методы, трёх глав (3-5) с результатами собственных исследований по разным классам генетических маркеров, включающих также частные обсуждения по этим данным, Главы 6, представляющей собой общее обсуждение данных по разным маркерам в сравнительном плане, а также Заключение, Выводов, Списка использованной литературы и Приложений. Общее число страниц диссертации 249, из которых 204 составляет основной текст, остальное – список литературы из 264 источников (из них 26 на русском языке, остальные на иностранных). Работа содержит 62 рисунков и 28 таблиц, размещённых в основном тексте. Семь таблиц и 2 рисунка вынесены в Приложение.

Во Введении автор подчеркивает актуальность исследования в контексте исследований внутривидовой генетической структуры бурого медведя, филогеографии и ландшафтной генетики, которая не вызывает сомнений, оценивает степень разработанности темы, подчёркивая недостаток данных по остальной, кроме Европейской части, территории страны. Далее автор достаточно чётко формулирует и обосновывает поставленные цель и задачи, описывает научную новизну работы, её теоретическую и научно-практическую значимость, методы исследования. Приводятся положения, выносимые на защиту. Автор декларирует степень своего личного участия в различных аспектах работы, которую следует оценить как высокую. Степень достоверности результатов, в частности, подтверждается солидным списком конференций и других представительных научных форумов, включая международные, где были представлены и апробированы результаты работы. Приводится статистика опубликованных работ по теме диссертации. Автор также описывает участие в реализации научных грантов (РФФИ) и проектов (Программы РАН) и успехи по

внедрению результатов своей работы (сотрудничество с заповедником «Брянский лес» и др.), имеющих место к настоящему моменту. Приводится объём и структура диссертации. Завершается Введение Благодарностями.

Глава 1 – Обзор литературных источников содержит четыре раздела. В первом из них (1.1.) приводятся краткая биологическая характеристика. Второй раздел главы (1.2) обобщает сведения об ареале бурого медведя. Раздел 1.3 посвящён подвидовой структуре объекта исследования в Старом и Новом Свете. Завершает литературный обзор раздел 1.4, посвящённый исследованиям бурого медведя с помощью молекулярно-генетических методов, каждому типу маркеров посвящен свой раздел (для основных маркеров – микросателлитов и мтДНК, использованных автором) или подраздел (для методов, которые автор называет «другими»).

В целом нужно отметить, что обзор литературы содержит практически все необходимые источники и их аналитический обзор, он хорошо структурирован, логично построен, информативен. Литературный обзор по объёму адекватен освещённым в нём сложным вопросам, относящимся к различным аспектам диссертационной работы. Это позволило автору проанализировать достижения мировой науки в предметной области работы и пробелы, которые призвано заполнить данное исследование, и в целом автор успешно справляется с этой задачей. Следует особо отметить хороший и грамотный научный язык как этого раздела, так и работы в целом.

Глава 2 посвящена описанию использованного Материала и Методов исследований. Число исследованных молекулярно-генетическими методами (всего 178 образцов бурого медведя, число варьирует по разным маркерам от 73 по Y-хромосомным до 161 по «короткому» фрагменту мтДНК), но в целом достаточно для решения поставленных задач. Распределение мест происхождения образцов по российской части ареалу достаточно равномерно, за исключением большей части Восточной (Заенисейской) Сибири, почти не представленной в исследовании. Однако здесь важно, что автору удалось

впервые исследовать многие части ареала бурого медведя с помощью молекулярных методов достаточно подробно.

Методы выделения ДНК (2.2.1), выбранные маркеры и его обоснование (2.2.2), процедуры ПЦР-амплификации (2.2.3), фрагментного анализа и секвенирования (2.2.5) ДНК описаны достаточно подробно для их воспроизведения. Описано также молекулярное определение пола путём анализа экзона 5 гена амелогенина (2.2.4). Весь раздел производит очень хорошее впечатление, изложение подробно, методические описания тщательны и аккуратны. Подход, сочетающий маркеры с разным типом наследования (бипарентальные, по материнской и отцовской линиям) следует признать удачным и отвечающим цели и основным задачам работы.

А разделе 2.3 подробно описаны методы статистического и филогеографического анализа молекулярных данных, от первичной обработки сиквенсов до построения деревьев (2.3.1). Для мтДНК автор использовала несколько методов, ключевым являлся метод байесовских деревьев с аутгруппами (для выявления топологии) и без них (для оценки времени возникновения гаплогрупп с калибровкой по реперным точкам). Для аутосомных микросателлитов (2.3.2) и Y-хромосомных маркеров (2.3.3) статобработка также описана подробно и грамотно, с цитированием всех использованных источников литературы и компьютерных программ, пакетов и онлайн-сервисов, выбор которых адекватен структуре данных и задачам работы. Раздел 2.3.4 описывает процедуры расчёта географических дистанций между особями.

В Главе 3 приведены результаты собственных исследований изменчивости 10 высокополиморфных аутосомных микросателлитных локусов.

Глава 4 посвящена исследованию изменчивости мтДНК бурого медведя.

В Главе 5 приведены результаты исследования Y-хромосомных маркеров, наследуемых по отцовской линии. Использовано 8 микросателлитов и один SNP.

Каждая из этих глав результатов содержит много оригинальной информации, полученной в ходе собственного исследования молекулярной

изменчивости. При этом факты сопоставляются как внутри собственных массивов данных, так и ставятся в контекст мировой системы знаний о генетическом полиморфизме бурого медведя. Автор тщательно сравнивает каждый факт с уместными литературными источниками по данному виду в Евразии и Северной Америке, в ряде случаев, особенно при обсуждении филогеографических паттернов, на которые могли повлиять сходные факторы, с данными по другим крупным хищным – волку и рыси.

Глава 6 интегрирует полученные по каждому маркеру результаты в единую систему, что стало возможным, в частности, поскольку все три класса маркеров исследованы на общей подвыборке образцов, то есть на одних и тех же особях. Несмотря на факт, что полученные частные паттерны по отдельным маркерам не всегда совпадают, автор не просто констатирует этот факт, а посвящает много места выяснению причин несоответствий в зависимости от характеристик самих маркеров или пола животных – их носителей. В целом ряде случаев такой подход позволил выявить новую информацию и сформулировать некие общие закономерности распределения генетической изменчивости по ареалу исследуемого вида. Так, все маркеры согласованно свидетельствуют о генетической обособленности медведей Кавказа, а также о существовании дифференциации медведей уральских и сибирских популяций в широтном направлении (которая в диссертации названа «долготной структурой», с. 179). Весьма продуктивной выглядит и точка зрения, что антропогенное влияние вносит свой неожиданный вклад в гомогенизацию генных пулов хищников. Так, для медведей Европы, несмотря на сильную фрагментацию ареала и элиминацию значительной части особей в результате отстрела охотниками подразделённости популяции держится на относительно стабильном уровне, ограниченная потоком генов через рекрутируемых из соседних локальностей особей-мигрантов (с. 184). При этом данные от различных маркеров взаимодополняют друг друга и вносят свой вклад в наблюдаемую картину внутривидовой дифференциации, которая всё же остаётся достаточно сложной и запутанной,

несмотря на все предпринимаемые усилия её разрешить с применением всё более богатого арсенала методов и ископаемых образцов.

Весьма интересен и содержателен раздел 6.3, где автор суммирует имеющиеся сведения о подвидовой и генетической структуре у бурого медведя, обращая внимание, что напрямую они не проецируются одна на другую. Однако молекулярные данные дают возможность оценить уровень генетической дифференциации, лежащей в основе этих группировок.

Несмотря на общий высокий научный уровень работы, можно сделать некоторые замечания, не имеющие, впрочем, принципиального характера.

С.8. По постановке задач. Поскольку автор выделила специальную 6-ю главу, в которой провела сравнительный анализ данных по разным маркерам, что несомненно украсило работу, то следовало бы отразить это в списке задач исследования (см. Введение).

При упоминании подвидов бурого медведя в Америке, на мой взгляд, перед описанием курьёзной ситуации с работой Х. Мэрриам и множеством (десятками) выделенных на определённом этапе таксонов (родов, видов и подвидов), стоило бы упомянуть российского исследователя А.Ф. Миддендорфа, который ещё до этого включил ранее описанного в отдельный вид гризли в состав *U. arctos* в качестве подвида *U. a. horribilis*.

В целом при описании подвидовой структуры автор тщательно описывает представления авторов на выделение или объединение подвидов, но немного внимания уделяет признакам (морфологическим), на которых эти представления базируются.

С. 45. К сожалению, что касается работ, основанных методически на анализе аллозимного полиморфизма, единственной упомянутой в данном контексте стала статья Chestin, Mikeshina, 1998. В то же время среди нецитированных есть интересные, например, Hartl, Hell, 1994 (Biodiversity & Conservation. V. 3, P. 546–554), посвящённая причинам поддержания высокого уровня изменчивости восточнокарпатских медведей на фоне предполагаемого «бутылочного

горлышка». Тем более, что сам феномен обсуждается на с. 87 при цитировании более поздней статьи Straka et al., 2012.

В выводе 6, на мой взгляд, были бы уместны более осторожные формулировки относительно причин низкого разнообразия мтДНК в регионе, кроме недавнего заселения территории это может быть и «бутылочное горлышко», и «эффект основателя», а не только время существования вида. Может быть, следует мягче выразиться: «заселение медведем современного типа», ведь предполагать отсутствие в уральском регионе медведя комплекса *Ursus arctos* вообще до недавнего времени утверждение, на мой взгляд, недостаточно подкреплённое данными.

По терминологии.

С. 13: и далее по тексту (подпись в рис. 1.1 и т.д.), многократно – «Архипелаг Кадьяк». Собственно, так называется главный остров, а весь архипелаг называется по-русски Кадьякским.

С. 16: «Ареал обитания» - распространённый плеоназм, ареал вида – это область обитания по определению. Второе слово излишне.

В 2.3.3 упомянуто присвоение Y-хромосомным локусам «весов», что является совершенно корректным термином. Непонятно, зачем в дальнейшем обсуждении они называются автором «уровнями значимости» (С. 157, Абз. 1).

Неудачно назван раздел 2.3.4 – «Расчет географических дистанций между образцами». Правильнее выразиться «между местами/точками происхождения/сбора образцов» или каким-то сходным образом. Сами образцы могут находиться и в одном холодильнике, и в одном штативе.

С. 30. Абз. 3 и далее по тексту: Не вполне понятно, почему автор предпочитает употреблять слово «аллель» в женском грамматическом роде, трудно заподозрить автора в принадлежности у ленинградской/санкт-петербургской школе генетики. Конечно, ошибкой это не является, оба варианта правильны, но в мужском роде «аллель» в русском языке в настоящее время употребляется значительно чаще (Синюшин, 2016).

С. 41: Абз.2: «Хентья». Очевидно, имеется в виду Хэнтэй (иногда Хэнтай). Именно так по-русски именуется это горная система. «Хентий» это часть монгольского названия.

С. 48: «Института Экологии Растений и Животных» - по-русски, кроме первого слова, никакие иные слова, кроме имён собственных, в названиях организаций и подразделений, не пишутся с заглавных букв.

С. 52: «один нуклеотидный полиморфизм» - должно быть «один однонуклеотидный полиморфизм».

С. 58: Для перевода английского burn-in (дословно скорее «выгорание» или «обжиг», если речь о гончарном производстве) по смыслу лучше использовать слово «разогрев», а не «отжиг».

С. 88: Абз. 4: ...«конкатенантной»... «Конкатенантный» - видимо, является продуктом авторского словообразования. Стандартным является термин «конкатенированный».

С. 201: «перигляционных» озёр. Правильное написание «перигляциальных».

Грамматические несогласования единичны (С. 106 «на Рисунок 4.12», С. 119 – «конкатенатного фрагмент»). То же относится к опечаткам (С. 121 – «Эльбурс» вместо Эльбрус.

По цитированию и оформлению списка литературы:

С. 51-52: На границе этих страниц. Каждая из нескольких ссылок, идущих подряд массивом, даны почему-то каждая в отдельных скобках.

Часто при цитировании в тексте не сокращаются три автора до первого+et al.

Высказанные замечания, тем не менее, не имеют принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работы.

Работа хорошо структурирована, что позволило подробно описать полученные результаты и тщательно обсудить их. Научный стиль текста диссертации заслуживает самой высокой оценки. Оформлена диссертация тщательно, рисунки и таблицы наглядны и информативны.

Рассматриваемая диссертационная работа представляет собой существенный вклад в решение ряда **фундаментальных** проблем зоологии, эволюционной биологии и популяционной генетики. При этом **практическая значимость** работы также несомненна. Материалы диссертации могут быть использованы при инвентаризации биоразнообразия, организации изучения и охраны популяций крупных хищных млекопитающих на основе знаний о структуре их генофонда. Результаты работы, несомненно, найдут применение при подготовке и повышении квалификации студентов, аспирантов и специалистов в области биологии в системе Минобрнауки. Пилотное применение подходов и результатов на примере индивидуальной идентификации медведей «Брянского леса» описано в самой работе.

В целом, нужно отметить, что автором проделан большой объем исследовательской работы, выборки и их репрезентативность достаточны для достижения заявленной цели. Применение избранных методов обоснованно, все выводы основаны на анализе данных и их обсуждении, что не позволяет сомневаться в достоверности полученных автором результатов. Содержание работы достаточно полно отражено в опубликованных статьях и автореферате. По теме диссертации автором опубликовано 15 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 1 глава в коллективной монографии «Bears of the World: Ecology, Conservation and Management», Cambridge University Press, 2020 в соавторстве, 4 работы в рецензируемых журналах из списка, рекомендованного ВАК: отечественные переводные «Известия Российской академии наук. Серия биологическая» и «Генетика», а также специализированный журнал *Ursus* (реферируется Scopus, SJR=0,419 (2020), а также журнал с достаточно высоким ИФ (2.0) – *Biological Journal of the Linnean Society* (Web of Science и Scopus). Опубликовано также 14 тезисов конференций. Результаты широко представлены и апробированы на авторитетных научных конференциях и школах, в том числе с международным участием на территории РФ и международных, проходивших за рубежом (Анкоридж, США; Любляна, Словения; Берлин, Германия; Ереван, Армения и др.).

Таким образом, представленная Валентиной Валерьевной Саломашкиной диссертационная работа является завершённым фундаментальным оригинальным научным исследованием, **отвечает** всем требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а также критериям, изложенным в пп. 9-11, 13-14 утвержденного Правительством РФ Постановления №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Саломашкина В.В. **заслуживает** присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 - зоология.

Главный научный сотрудник, заведующий отделом популяционной генетики, заведующий лабораторией популяционной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, доктор биологических наук,
119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3, тел. +7(499)135-5067, +7(499)135-6213
Email: dmitri_p@inbox.ru, dmitri.p17@gmail.com, Вебсайт <http://www.vigg.ru/>

8 сентября 2023 г.

Политов Дмитрий Владиславович

Подпись Д.В. Политова заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
доктор биологических наук,

Горячева Ирина Игоревна

8 сентября 2023 г