

Отзыв официального оппонента
на диссертацию
Юлии Владимировны Михайловой
«ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ АРКТО-АЛЬПИЙСКОГО
ВИДА *SILENE ACAULIS* (L.) JACQ. (CARYOPHYLLACEAE)»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук
по специальности 03.02.01 – «Ботаника»

Диссертация Юлии Владимировны Михайловой посвящена исследованию истории формирования аркто-альпийского ареала, генетической структуры популяций и родственных связей *Silene acaulis* с использованием молекулярно-генетических методов.

Целью работы были, соответственно, филогеографическое исследование собственно *S. acaulis* и молекулярно-филогенетическое исследование трибы *Sileneae*.

Актуальность темы диссертации несомненна по нескольким причинам. С одной стороны, изучение популяционно-генетической структуры и истории ее формирования у широкоареальных арктических растений важно для понимания и возможного прогнозирования изменений растительного покрова Арктики в ходе глобальных климатических изменений, как прошлых, так и современных. С другой стороны, *S. acaulis* относится к таксономически сложной группе с крайне неоднозначным среди разных исследователей пониманием границ родов и родства отдельных видов. Сам исследуемый вид в последнее время выделялся Н.Н. Цвелёвым в отдельный род *Xamilenis*, вместе с балканским эндемиком *S. dinarica*. Поэтому уточнение родства *S. acaulis* и ее положения в таксономической структуре трибы также представляет немалый интерес.

нуклеотидные последовательности которых заимствованы из базы данных GenBank, и полное филогенетическое дерево трибы Sileneae по последовательностям ITS.

Глава 1 посвящена обзору существующей литературы по теме работы и состоит из нескольких разделов. В первом разделе главы дается характеристика основного объекта исследования – *S. acaulis*. Подробно рассмотрены экологические и географические особенности этого вида, приведена карта его ареала, приводятся сведения по его экологической физиологии и системе размножения. Отдельные подразделы посвящены весьма подробному рассмотрению внутривидового разнообразия, выделяемым в пределах вида разновидностям и подвидам, близким видам и положению бесстебельной смолевки в системе трибы Sileneae. Во втором разделе рассматриваются вопросы истории ландшафтов и растительного покрова Крайнего Севера и формирования современной арктической флоры. Отдельный подраздел посвящен проблеме рефугиумов и различных трактовок этого понятия разными авторами. Отдельно рассматривается роль Берингии, как рефугиума и моста суши между Азией и Америкой. Специальные подразделы главы посвящены обсуждению современных представлений о генетическом разнообразии растений и видообразовании в Арктике, в том числе, проблемам послеледникового заселения освободившихся от ледника территорий в голоцене и дальнего заноса семян. Третий раздел литературного обзора специально посвящен методам филогеографии применительно к растениям, используемым для этих целей молекулярным маркерам и методам анализа данных. В целом, приведенный в диссертации обзор литературы по заявленной проблематике можно считать исчерпывающим. И это не удивительно, так как в диссертации цитируется 304 литературных источника, в том числе, 240 – зарубежных.

В главе 2 подробно характеризуются изученный автором материал и методы исследования. Для филогеографического анализа *S. acaulis* были использованы 458 образцов из 102 популяций, что обеспечило практически полный охват видового ареала. В таблице 2.1 приведены сведения обо всех образцах, использованных в исследовании, в том числе об образцах других видов смолевок, из которых были секвенированы последовательности ITS и хлоропластного интрона гена *trnL* для

филогенетического анализа трибы. В их числе образцы из гербариев Санкт-Петербурга, Москвы, Иркутска, Осло, а также собранные автором в ходе полевых работ на Чукотке и в Ленинградской области. Из написанного можно заключить, что работа выполнена на вполне репрезентативной выборке, как в части исследования филогеографии *S. acaulis*, так и в части реконструкции филогении трибы Sileneae. Далее в главе подробно описываются методы выделения ДНК из растительных тканей, использованные в работе, методы амплификации и секвенирования. Отдельный раздел посвящен методам филогенетического анализа. Выравнивание последовательностей проводилось с помощью алгоритма MAFFT, выравнивания анализировались методами NJ в программе MEGA и методом Байеса в программе MrBayes. Описанные методы анализа нуклеотидного состава ДНК и реконструкции филогенетических отношений вполне адекватны задачам исследования. Два раздела главы посвящены подробному описанию методов генерации AFLP маркеров и анализа полученных данных в программах STRUCTURE, BAPS, SAMOVA и Arlequin. Выбранные диссертантом методы и программы адекватны поставленным задачам исследования популяционно-генетической структуры вида на всем протяжении ареала.

Глава 3 посвящена описанию полученных автором результатов. В первом разделе главы описаны результаты анализа нуклеотидных последовательностей ITS у представителей трибы смолевковых. Описаны они исключительно подробно, не ограничиваясь, как это часто бывает, кратким описанием полученной дендрограммы. Приводятся последовательности мотивов, с которых начинаются и которыми заканчиваются участки ITS1, 5.8S и ITS2 у разных видов смолевковых; обсуждаются количественные соотношения нуклеотидов; рассчитаны модели эволюции каждой из трех последовательностей и всего участка в целом у представителей трибы Sileneae и, отдельно, для субклады, к которой относится *S. acaulis*. На основании рассчитанных моделей Ю.В. Михайловой проведен филогенетический анализ методом Байеса в программе MrBayes и построены филогенетические деревья для трибы в целом и для субклады, содержащей *S. acaulis* и родственные ей виды. Для *S. acaulis* выделены 4 гаплотипа, рассмотрено их

географическое распространение и проведен дополнительный анализ методом NeighborNet в программе SplitsTree3.

Рассматриваемый раздел работы выполнен на очень высоком уровне и с абсолютно корректным и хорошо обоснованным выбором методов анализа. Вместе с тем, к нему остается несколько вопросов, ответов на которые я в тексте диссертации не нашел, а именно:

1. Почему автор ограничилась филогенетическим анализом методом Байеса и не попыталась построить филогенетические деревья альтернативными методами – максимального правдоподобия и максимальной экономии?

2. Почему для построения филогенетической сети методом NeighborNet была использована давно устаревшая программа SplitsTree3, а не современная версия SplitsTree4? При анализе внутривидовой изменчивости последовательностей ITS у *S. acaulis* следовало использовать внешнюю группу, в которую могли войти последовательности видов, наиболее близких к исследуемому. Это позволило бы поляризовать сеть, полученную методом NeighborNet, и оценить последовательность происхождения популяций *S. acaulis*.

3. Почему автор ограничилась чисто филогенетическими подходами и не стала анализировать данные по внутривидовой изменчивости *S. acaulis* методами реконструкции генеалогий гаплотипов, такими как статистическая парсимония (в программе TCS) или объединение медиан (в программе Network)? Мне представляется, что анализ генеалогий ядерных и хлоропластных последовательностей в сочетании с картированием географического распространения гаплотипов позволил бы диссертанту получить ценную для ее исследования информацию о направлениях миграций. При этом можно было бы извлечь полезную информацию и из синглетонов, которые она в своей работе не использовала. Например, концентрация синглетонов, связанных с одним и тем же центральным гаплотипом, в определенных географических областях может указывать на территории, которые вид занимает уже очень длительное время. Эти замечания относятся и к проведенному автором анализу хлоропластных последовательностей интрона *trnL*.

Филогенетический анализ хлоропластных последовательностей интрона *trnL* проведен автором по той же схеме, что и анализ ITS, и с такой же тщательностью. Дополняет его отдельное исследование инделей, как синапоморфий клад, выявленных в результате этого анализа. Сами индели не учитывались при реконструкции филогении, что понятно, так как они не могут быть учтены при расчете модели для анализа методом Байеса. Однако, если бы автор параллельно провела реконструкцию филогении методом максимальной экономии с учетом информации, содержащейся в инделях, ей, вполне возможно, удалось бы добиться лучшего разрешения узлов на полученной кладограмме.

Третий раздел главы посвящен уже собственно анализу генетической структуры популяций и филогеографии *S. ascaulis* по данным AFLP маркирования. Исходные данные и процедуры анализа описаны детально. Для анализа популяционной структуры по полученным 355 AFLP маркерам были использованы различные подходы: ординация методом многомерного шкалирования и различные виды неиерархической кластеризации в программах STRUCTURE и BAPS. Автором проанализировано географическое распространение образцов, относимых к различным генетическим кластерам, проведен анализ молекулярной дисперсии между различными группами популяций и показано, что в большинстве случаев наибольшая доля дисперсии приходится на внутрипопуляционную изменчивость. Наибольшие различия наблюдаются только между европейской и канадской группами популяций. Автором проведен также пространственный анализ молекулярной дисперсии, показавший, что наиболее вероятно выделение пяти групп популяций: трех европейских и двух американских. Филогеографическая структура анализировалась также отдельно для европейских и американо-берингийских популяций; специальный раздел посвящен попытке установить происхождение популяций Шпицбергена. В целом, исследование проделано очень тщательно и на современном уровне. Однако и здесь возникают некоторые вопросы к автору.

Так, мне непонятна строгая приверженность Юлии Владимировны статистическим и популяционно-генетическим методам в ущерб филогенетическим. Автор все время пытается оценить различия между популяциями, но не их сходство. Почему не был проведен хотя бы элементарный иерархический кластерный анализ

любым методом (UPGMA, NJ)? Это позволило бы соподчинить группы популяций и попытаться установить направления, в которых происходило расселение *S. acaulis* напрямую, а не пользуясь только косвенными оценками. Вследствие этого, из филогеографического анализа, проведенного автором, как-то почти полностью выпадает компонент «фило-», остается одна географическая структура изменчивости. При этом она все же использует метод NeighborNet для анализа популяций Северной Америки и Чукотки, но лишь для того, чтобы подтвердить неправомерность выделения двух подвидов на этой территории. Почему такой анализ не был проведен для всей выборки – непонятно.

Четвертая глава диссертации посвящена обсуждению полученных результатов. В первом разделе обсуждаются молекулярная филогения и таксономические системы трибы Sileneae. В этом разделе автор сравнивает существующие системы трибы отечественных и зарубежных авторов и предыдущие молекулярно-филогенетические построения с полученными ею результатами. Результаты эти надо признать замечательными, во многом проясняющими таксономическую структуру трибы и решающими многие спорные вопросы по признанию или не признанию целого ряда групп в качестве самостоятельных родов. В конце раздела приводится сравнительная таблица таксономического деления трибы разными авторами в сравнении с полученными диссертантом результатами молекулярно-филогенетического анализа.

Во втором разделе подробно обсуждается проблема выделения *S. acaulis* в отдельный род *Xamilenis*. На этот вопрос дается хорошо аргументированный отрицательный ответ на основании полученных автором результатов. Вместе с тем, полученные результаты о близком родстве секций *Siphonomorpha* и *Nanosilene* оказываются достаточно неожиданными с морфологической точки зрения и требуют дополнительного исследования.

В следующих двух разделах обсуждаются проблемы выделения подвидов у *S. acaulis* в Северной Америке и на Чукотке и внутривидового генетического разнообразия этого вида в разных частях ареала. Отдельный раздел посвящен проблеме ледниковых рефугиумов и попытке установить их для *S. acaulis* на основании индекса DW, т.е. популяций с повышенным уровнем редких AFLP

маркеров. В следующем разделе обсуждаются проблемы послеледникового расселения *S. acaulis* и проблема дальнего заноса. Все эти разделы написаны грамотно и интересно, видно, что автор прочитала большой объем отечественной и зарубежной литературы по этой тематике и хорошо в ней ориентируется. Тем не менее, именно эта часть обсуждения вызывает целый ряд вопросов. Автор почему-то твердо уверена, что расширение ареала *S. acaulis* происходило в голоцене уже после отступления ледника, а также, вероятно, и в предшествующие межледниковья. При этом во время максимумов оледенения вид сохранялся в рефугиумах. Такая схема, несомненно, верна для растений умеренного пояса. Но для растений аркто-альпийского типа распространения, мне представляется более вероятным сценарий расселения непосредственно во время плейстоценовых оледенений с сохранением в рефугиумах в межледниковья, в том числе и в настоящее время. Юлия Владимировна цитирует в 1 главе работу С.В.Тормидиаро (1976), но, видимо, она ее невнимательно читала. Ведь именно он впервые выдвинул аргументы в пользу того, что покровные ледники представляли собой не голые ледяные панцири вроде тех, что сохранились сейчас в Гренландии и Антарктиде, а ледово-лессовую равнину, покрытую растительностью и являвшуюся, в частности, средой обитания мамонтов и крупных копытных млекопитающих. Кроме того, такая концепция снимает проблему дальнего переноса семян из Европы в Америку, так как между ними мог тогда существовать сухопутный (хотя внутри и ледяной) мост.

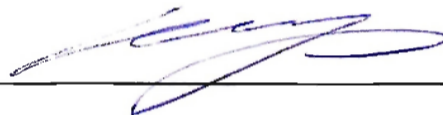
Завершают работу заключение и выводы, которые сформулированы четко и вполне подтверждаются полученными автором результатами, изложенными в тексте диссертации.

Высказанные мною в отзыве замечания носят дискуссионный характер и ни в коей мере не умаляют заслуг автора диссертации, которой проделана огромная работа и получены совершенно новые и исключительно интересные результаты. Результаты исследования апробированы на ряде всероссийских и международных конференций. По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ для публикации результатов кандидатских диссертаций. Автореферат, по структуре и содержанию соответствует содержанию диссертации.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Юлия Владимировна Михайлова, несомненно, достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01. – «ботаника».

Отзыв представил:

Шанцер Иван Алексеевич _____



доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории Гербарий

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Адрес: Москва 127276, Ботаническая ул., д. 4

Телефон: 8(499)977-8033

e-mail: ischanzer@gmail.com

Дата: 3 октября 2016 г.

Подпись И. А. Шанцера заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
ГЛАВНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА им. Н.В. ЦИЦИНА
Российской академии наук

