

Чернова О.Ф.

ведущий научный сотрудник отдела НМОПЭ
ФБУ РФЦСЭ при Минюсте России,
доктор биологических наук

Перфилова Т.В.

заместитель заведующего лабораторией СПиБЭ
ФБУ РФЦСЭ при Минюсте России

Киладзе А.Б.

старший научный сотрудник
Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова,
кандидат технических наук

Сорокин П.А.

научный сотрудник Кабинета методов молекулярной диагностики
Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова,
кандидат биологических наук

АЛГОРИТМ ПРИМЕНЕНИЯ СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЛОС ПОДВИДОВ И ГИБРИДНЫХ ФОРМ ЛЕОПАРДА PANTHERA PARDUS

Работа посвящена методическому аспекту проведения биологической экспертизы волос млекопитающих на примере подвидов и гибридных форм леопарда с помощью методов многомерного статистического анализа.

Ключевые слова: судебно-биологическая экспертиза, волосы животных, дискриминатный анализ, кластерный анализ, факторный анализ.

O. Chernova

Lead research associate Forensic Research Methodology Department Russian Federal Center of Forensic Science of the Ministry of Justice of the Russian Federation
DSc (Biology)

T. Perfilova

Deputy head of the Laboratory of Forensic Biology and Soil Analysis
Russian Federal Center of Forensic Science of the Ministry of Justice of the Russian Federation

A. Kiladze

Senior research associate Severtsov Institute of Ecology and Evolution
PhD (Engineering)

P. Sorokin

Research associate
Molecular Diagnostics Methods Room Severtsov Institute of Ecology and Evolution
PhD (Biology)

AN ALGORITHM FOR APPLYING STATISTICAL METHODS IN THE IDENTIFICATION OF SUBSPECIES AND HYBRIDS OF PANTHERA PARDUS

The study focused on the methodological aspect of applying multivariate statistics in the forensic biological analysis of mammalian hair, using samples from subspecies and hybrids of leopard.

Keywords: forensic biological analysis, animal hair, discriminant analysis, cluster analysis, factor analysis.

В октябре 2013 года Правительство РФ приняло постановление, в котором приведен перечень особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, незаконная добыча и оборот которых повлечет за собой наказание в соответствии с Уголовным кодексом РФ (1). В связи с этим на судебно-биологическую экспертизу стали направляться объекты редких животных мира, в том числе выделанные и невыделанные шкуры различных зверей с целью определения видового, подвидового или гибридного статуса тестируемого животного, его принадлежности к видам, занесенным в Красную книгу Российской Федерации и (или) охраняемым международными договорами Российской Федерации и др. В настоящее время, подвидовой или гибридный статус тестируемого животного может быть определен только с помощью методов молекулярно-генетического анализа. Однако на сегодняшний день эти методы не нашли широкого применения в системе судебно-экспертных учреждений Минюста России по целому ряду объективных причин. Вот почему в последние годы морфологическое судебно-биологическое исследование волос млекопитающих не теряет своей актуальности и является важнейшей составляющей методики как видовой, так и индивидуальной идентификации объектов биологического происхождения и зоологического в частности. Однако морфологические признаки волос разных подвидов и их гибридов у одного вида зачастую обладают большим сходством, и достоверность определения их видовой или индивидуальной принадлежности весьма невелика.

Одним из важнейших идентификационных признаков волос млекопитающих служат их абсолютные (длина, толщина) и относительные (индекс сердцевины, индекс кутикулы и др.) морфометрические показатели. С помощью методов статистического анализа при обработке репрезентативных цифровых данных возможно выявление достоверных различий и проведение фенетических сопоставлений. В таком аспекте морфометрические данные необходимо рассматривать в качестве идентификационных критериев, которые в совокупности с признаками волос, выявляемых визуальным образом, и качественными признаками микроструктуры волос, позволяют добиться целенаправленного распознавания изучаемого объекта. Вместе с тем успех возможен лишь при использовании подходящего

алгоритма многомерного статистического анализа, с помощью которого успешно анализируются множественные промеры.

Цель работы используя методы многомерного статистического анализа, показать систему взаимоотношений различных подвидов и гибридных форм, а также выявить наиболее значимые количественные морфометрические показатели волос млекопитающих для таких сопоставлений. Для достижения этой цели были применены методы дискриминантного, кластерного и факторного анализов при помощи статистической программы STATISTICA 6, разработанной компанией «StatSoft» (США) (2). В качестве объекта исследования выбран леопард (*Panthera pardus*), и этот выбор — неслучаен, поскольку этот «краснокнижный» вид имеет 9 подвидов (или даже больше) и гибридные формы, что доказано молекулярно-генетическими методами (3,5,6).

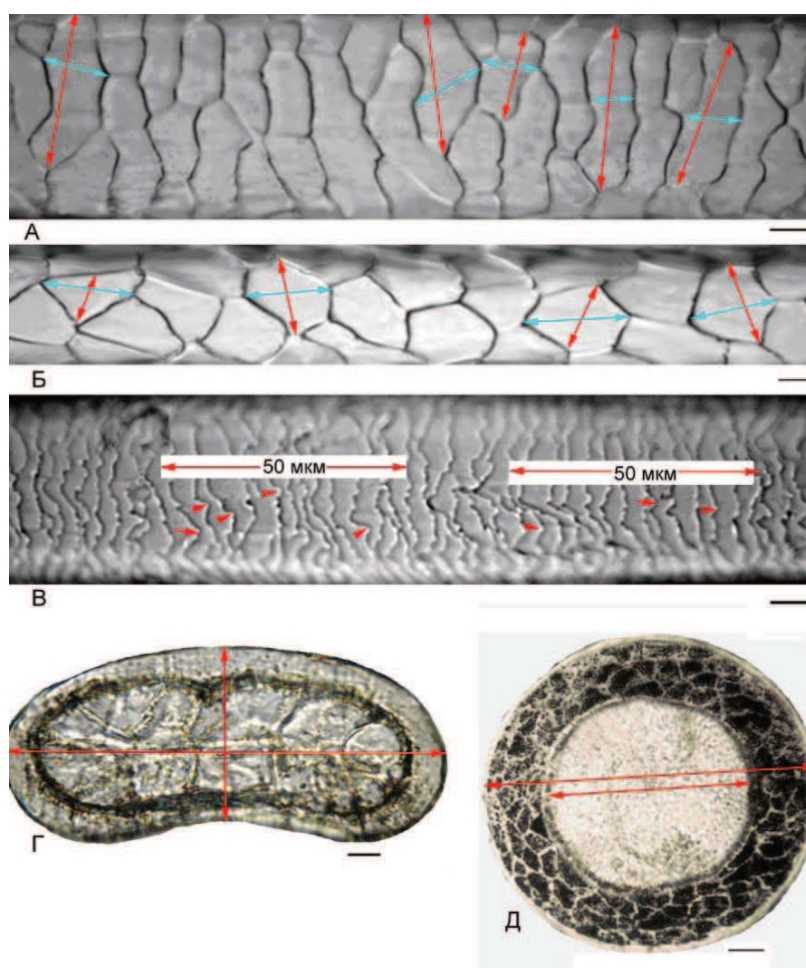
Материал и методики

Для выполнения работы использовали нативные волосы особей леопарда из коллекции Кабинета методов молекулярной диагностики Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова. Образцы волос со спины взрослых леопардов зафиксированы в 96%-ном этиловом спирте (Табл. 1). Для сравнения изучены образцы волос двух взрослых особей европейской лесной кошки *Felis silvestris*.

Использована общепринятая препаративная техника. Из каждого образца в поле зрения стереоскопического бинокулярного микроскопа «Leica MZ6» при увеличении 8–40 отобраны остевые волосы (по 10 штук) различных размерных порядков (каждый волос нумерован от 1 до 10). Тестируемые волосы отмыты от загрязнений, обезжирены в 70° этиловом спирте в чашках Петри и высушены при комнатной температуре. У каждого тестируемого волоса измерена длина стержня в расправленном виде. После этого по общепринятой методике сделаны отпечатки на лаке кутикулы по всему стержню. После высыхания лака волос снят с подложки и на предметном стекле изготовлены его поперечные срезы в наиболее расширенной части стержня — ручным способом при помощи бритвенного лезвия под контролем в стереоскопическом бинокулярном микроскопе. Полученные срезы помещены в просветляющую среду под покровное стекло для дальнейшего микроскопирования. Приготовленные микро-

Таблица 1. Перечень изученных взрослых особей леопарда *Panthera pardus* и европейской лесной кошки *Felis silvestris*

Подвид	№ особи	Пол, возраст, регистр. номер, дата добычи	Местообитание
Дальневосточный <i>P.p. orientalis</i>	1	Самец, 14 лет, № 50007	Московский зоопарк
	2	Самка, 9 лет, № 30260	
	3	Самец, 6 лет, № 60228	
Переднеазиатский <i>P.p. saxicolor</i>	1	Самец	Иран
	2	Самка	
	3	Самка	
Южно-китайский <i>P.p. delacouri</i>	1	?, добыт 18.11.2011	Вьетнам
Гибрид	1	Самка, 9 лет	Геленджикский зоопарк
	2	Самка, 4 года	
Европейская лесная кошка <i>F. silvestris</i>	1	Выделанная шкура, пол неизвестен	Кавказ
	2		



препараты исследованы в световом микроскопе Leica DMLS (Германия) с использованием окуляра 10× и объективов 40× и 63×. Изображение получены с помощью цифровой камеры «Leica DFC 320» и программы Adobe Photoshop 7.0CE в операционной среде Windows XP и сохранены в формате BMP с исходным размером 2088 × 1550 × 24 bit. Измерены максимальный и минимальный диаметр волоса, а также индекс сердцевины как отношение её диаметра к диаметру волоса (Рис. 1). Орнамент кутикулы фиксирован в основании и в наиболее расширенной части стержня. Все снимки масштабированы. На полученных снимках сделаны промеры (максимальная высота и ширина) 10

Рис. 1. Основные промеры структур остевых волос леопарда. А — ширина (красный цвет стрелок) и высота (голубой цвет стрелок) чешуек кутикулы в основании стержня. Б — то же выше по стержню. В — подсчет числа вершин чешуек кутикулы (показаны короткими стрелками) на расширенном участке стержня длиной 50 мкм. Г — промеры на поперечном срезе расширенного участка стержня. Д — промеры диаметра стержня и сердцевины. Масштабная линейка — 10 мкм.

Таблица 2. Морфометрия тестируемых волос подвидов и гибридных форм леопарда (средние значения, n=10)

Признаки волос	ДВЛ1	ДВЛ2	ДВЛ3	ПАЛ1	ПАЛ2	ПАЛ3	ЮКЛ	ГИБ1	ГИБ2
Длина, мм	17,8	19,2	22,1	24	17,6	44	11,1	24,8	21,6
Толщина тах, мкм	90	93,8	86	62,3	42,2	67	67,5	71,1	71,4
Индекс сердцевины	49,5	77,7	53,2	55,7	14,4	46,1	55,9	45,7	60,2
Индекс кутикулы в основании стержня*	14,6	16,5	15,3	13,1	8	21	7,8	5,1	6,6
Количество вершин чешуй на 50 мкм длины стержня в области гранны	9,6	8,4	9,4	8,4	6,7	8	8,3	7,9	7,5
Отношение максимального диаметра к минимальному **	11,2	16,7	13	11,3	12,5	12,9	12,6	12,8	13,6
Высота чешуй в основании стержня, мкм***	14,8	17,1	15,7	17	20,7	14,4	20,4	29	24,3
Ширина чешуй в основании стержня, мкм***	19,2	25,7	23,5	19,1	15,7	26,6	15,6	14,4	15,6

произвольно выбранных чешуек кутикулы в основании стержня с помощью масштабной линейки (Рис. 1). В области гранны изменены (по 10 промеров) количество вершин чешуй на 50 мкм стержня. Все полученные данные сведены в общую таблицу в программе Microsoft Excel.

Для кластерного анализа была составлена исходная матрица, включающая 8 морфометрических промеров от 9 особей леопарда, т.е. обработан 81 показатель и более 850 промеров (Табл. 2), каждый из которых является средним арифметическим 10 промеров. В таблицах и графиках использованы следующие условные обозначения: ДВЛ1, ДВЛ2, ДВЛ3 — особи дальневосточного леопарда; ПАЛ1, ПАЛ2, ПАЛ3 — особи переднеазиатского леопарда; ЮКЛ — особь южно-китайского леопарда; ГИБ1, ГИБ2 — особи гибридных форм; ЛЕК1 и ЛЕК2 — особи европейской лесной кошки.

Примечание:

* Индекс кутикулы — отношение шири-

ны чешуйки поперек стержня к ее высоте вдоль стержня, ×10.

** Это отношение определяет форму поперечника волоса в гранне — чем больше значение, тем более поперечник приближается к овалу; ×10.

*** Взяты средние данные по 10 промерам.

Результаты

На основании репрезентативных морфометрических данных провели дис-

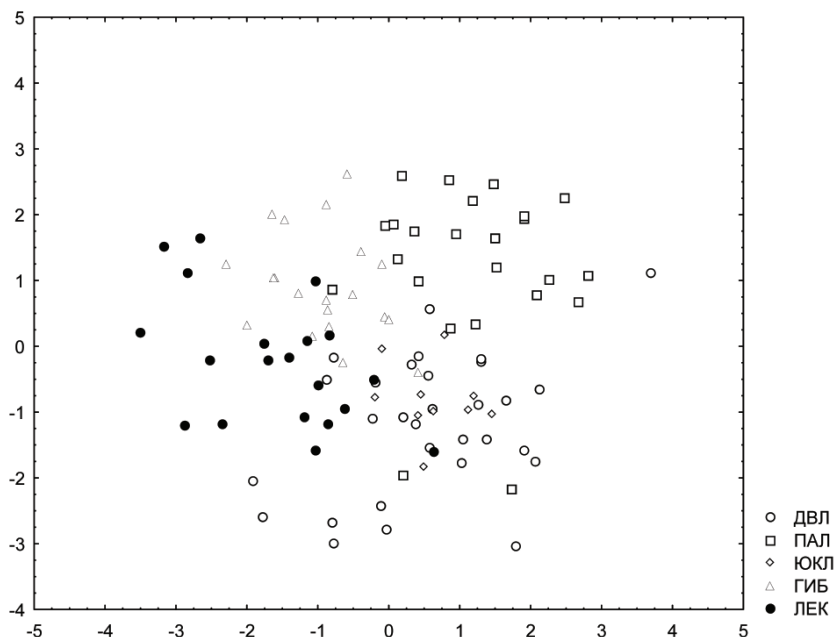


Рис. 2. Дискриминантный анализ морфометрических данных по волосам леопарда разных подвидов и гибридов, и европейской лесной кошки (n = 10 для каждого параметра, всего 810 промеров).

Таблица 3. Достоверность различий (по t-критерию Стьюдента) морфометрических показателей волос дальневосточного леопарда с таковыми у других изученных подвидов и гибридов

Морфометрический показатель (n=10)*	Подвид		
	Переднеазиатский N** = 3	Южно-китайский N = 1	Гибридные формы N = 2
Длина волос, мм	+ (p < 0,0004) —	+ (p < 0,003)	+ (p < 0,009) —
Толщина волос, тах, мкм	+ (p < 0,00001)	+ (p < 0,00001)	+ (p < 0,00001)
Индекс сердцевины	+ (p < 0,005)	+ (p < 0,00001)	+ (p < 0,00001)
Индекс кутикулы в основании стержня	+ (p < 0,008) —	+ (p < 0,005)	+ (p < 0,01)
Количество вершин чешуй на 50 мкм длины стержня в области гранны	+ (p < 0,005) —	+ (p < 0,00001)	+ (p < 0,0001) —
Отношение максимального диаметра к минимальному	+ (p < 0,01) —	+ (p < 0,04)	+ (p < 0,04) —
Высота чешуй в основании стержня, мкм	+ (p < 0,0007) —	+ (p < 0,01)	+ (p < 0,01) —
Ширина чешуй в основании стержня, мкм	+ (p < 0,001) —	+ (p < 0,01)	+ (p < 0,001) —

криминантный анализ с целью разграничения подвидов леопарда (Рис. 2). В качестве внешней группы добавлены аналогичные промеры для волос двух особей европейской лесной кошки.

Рисунок 2 демонстрирует значительную дистанцию между лесным котом и леопардом и обособленность переднеазиатского подвида и гибридных форм от общей группы дальневосточного и южно-китайского леопарда.

Индивидуальные различия. У трех особей дальневосточного леопарда длина волос, индекс кутикулы и высота чешуй в основании стержня достоверно не отличаются, однако, толщина волос, степень развития сердцевины, число вершин чешуй кутикулы на единицу длины волоса, ширина чешуй и пропорции поперечника имеют индивидуальные отличия.

У трех особей переднеазиатского леопарда все измеренные параметры несут индивидуальные черты, могут быть сходными или отличаться, лишь форма поперечника волоса и размеры чешуек одинаковы у всех особей.

У двух особей гибридных форм толщина волос сходна, форма поперечников, число вершин и высота чешуй одинаковы, остальные показатели могут быть сходными, а могут отличаться (Табл. 3).

Примечание: * n — число промеров; ** N — число изученных особей; + — различия статистически достоверны для всех изученных особей; — — различия статисти-

чески недостоверны для нескольких особей; p — доверительная вероятность

Таким образом, индивидуальный разброс параметров волоса достаточно широк и какой-то один диагностический признак для подвида выделить не удалось.

Подвидовые различия. Наиболее четко дальневосточный леопард отличается от переднеазиатского и южно-китайского по размерам волос, а от гибридных форм по индексу кутикулы и высоте чешуек кутикулы в основании стержня (Табл. 3). Остальные параметры могут отличаться, а могут и быть сходными у разных особей всех трех подвигов и гибридов. Переднеазиатский леопард достоверно отличается от южно-китайского длиной волос (p < 0,01) и шириной чешуй (p < 0,02). Остальные показатели могут либо одинаковы, либо разнятся у разных особей переднеазиатского леопарда и южно-китайского и гибридов. Южно-китайский подвид достоверно отличается от гибридов по длине волос (p < 0,0001), индексу кутикулы (< 0,00001), высоте (p < 0,001) и ширине (p < 0,00001) чешуек в основании стержня. Таким образом, из всех промеров наиболее значимыми для различения подвигов леопарда служат длина и толщина волос, что неудивительно, принимая во внимание различия в условиях обитания этих зверей. Впрочем, и другие показатели могут быть использованы при статистическом анализе с целью выявления подвидовых (и видовых) различий.

Для проверки этого положения, мы применили факторный анализ данных, предполагающий редукцию данных и позволяющий определить наиболее значимые морфометрические признаки, которые имеют значение при распределении изученных подвидов и гибридов леопарда. Факторная модель, основанная на восьми морфометрических показателях волос, представлена на рисунке 3.

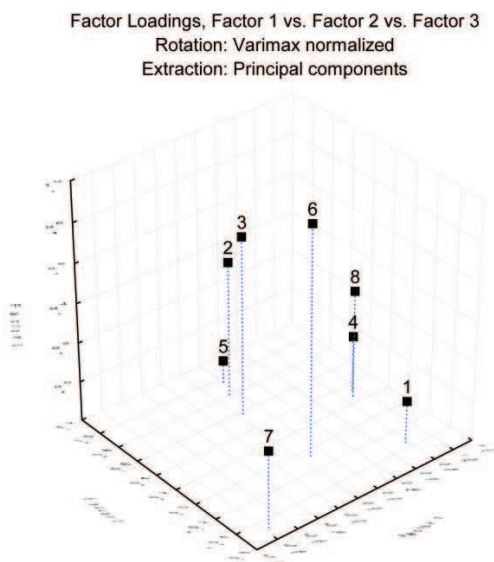


Рис. 3. Распределение морфометрических параметров волос леопарда в трехфакторном пространстве. Метод главных компонент. Использовано варимакс нормализованное вращение.

Установлено, что суммарное влияние трех факторов на общий уровень дисперсии морфометрических показателей составляет 89,33%. Первый фактор, объединяющий длину волос (1), индекс кутикулы (4), высоту чешуй в основании стержня (7), а также ширину чешуй в основании стержня (8), объясняет 36,36% суммарной дисперсии. Второй фактор, включающий толщину волос (2) и количество вершин чешуй на 50 мкм длины стержня в области гранны (5), объясняет 30,33% суммарной дисперсии. Третий фактор, состоящий из толщины сердцевины (3) и отношения максимального диаметра к минимальному (6), характеризует 22,64% суммарной дисперсии.

Таким образом, наиболее информативными с точки зрения фенетической классификации леопарда являются морфометрические показатели волос, относящиеся к первому фактору, что подтверждает наш

вывод, сделанный на основании морфометрического анализа.

Для дальнейшего подтверждения наших заключений построена фенограмма, в основу которой заложены параметры усредненных промеров для каждой изученной особи (Табл. 2). Фенограмма составлена по методу Уорда, при этом за метрическую основу приняты евклидовы расстояния. Сущность метода Уорда сводится к тому, что в качестве расстояний между кластерами используют прирост суммы квадратов расстояний до центров кластерных групп. На каждом шагу алгоритма объединяются такие два кластера, которые приводят к минимальному увеличению целевой функции, то есть внутригрупповой суммы квадратов (4). В фенограмме оперативной единицей служит особь определенного подвида или гибрида. Фенограмма представляет собой древовидный граф, сформированный девятью терминальными группами (по числу исследованных особей) Фенограмма (Рис. 4), в которой за основу взята изменчивость морфометрических показателей волос различных подвидов леопарда, свидетельствует о четком разделении изученных особей на несколько кластеров. Первый кластер сформирован тремя особями дальневосточного леопарда, при этом наиболее схожими являются морфометрические параметры волос первой (ДВЛ1) и третьей (ДВЛ3) особей, а морфометрия волос второй особи (ДВЛ2) имеет определенную дистанцию. Второй кластер отличается тем, что наиболее близкими по параметрам волос являются особь южно-китайского леопарда (ЮКЛ) и вторая особь гибридной формы (ГИБ2). Затем ближайшие к данной группе животных параметры волос демонстрирует первая особь переднеазиатского леопарда (ПАЛ1). На следующем этапе к ним примыкает первая особь гибридной формы (ГИБ1).

Необходимо пояснить, что описанные четыре особи леопардов имеют незначительную дистанцию друг от друга, что демонстрирует коэффициент подобия. В данном кластере лишь третья особь переднеазиатского леопарда (ПАЛ3) отличается существенной дистанцией от описанных четырех животных. Третий кластер образуют только параметры волос второй особи переднеазиатского леопарда (ПАЛ2), который отстранен от всех остальных особей. Фенограмма демонстрирует диаметрально противоположную локализацию первой

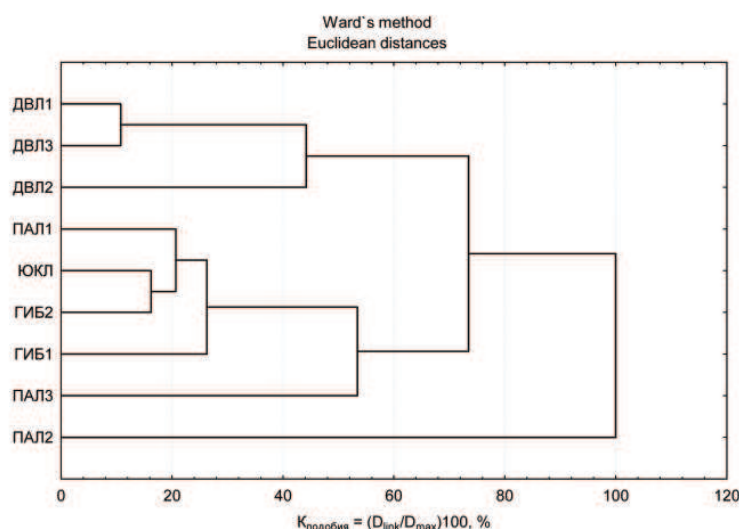


Рис. 4. Фенограмма различных подвидов и гибридных форм леопарда, основанная на уровне сходства или различия морфометрических параметров волос (Метод Уорда, евклидовы расстояния): $K_{\text{подобия}} = (D_{\text{link}}/D_{\text{max}})100, \%$; D_{link} — дистанция связи; D_{max} — максимальная дистанция

особи дальневосточного леопарда (ДВЛ1) и второй особи переднеазиатского леопарда (ПАЛ2), что говорит о значимых отличиях в морфометрических показателях исследованных волос.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что применение методов многомерного статистического анализа позволяет проанализировать большой массив количественных морфометрических данных, что, наряду с другими качественными микроструктурными характеристиками волос, позволяет с большой степенью достоверности решать задачи по установлению видовой принадлежности и индивидуализации тестируемых особей. Для введения предложенного нами алгоритма в практику судебно-биологической экспертизы необходимо расширить круг тестируемых видов, подвидов и пород, что и послужит дальнейшей задачей наших исследований.

Выводы

1) Применение методов многомерного статистического анализа морфометрических показателей волос целесообразно

для идентификации видов, подвидов и гибридных форм млекопитающих.

2) Из изученных подвидов леопарда дальневосточный леопард ближе южно-китайскому, чем переднеазиатскому.

3) Гибридные формы леопарда стоят особняком и значительно отличаются от подвидов.

Литература

1. Постановление Правительства РФ от 31.10.2013 № 978 «Об утверждении перечня особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, принадлежащих к видам, занесенным в Красную книгу РФ и (или) охраняемым международными договорами РФ, для целей статей 226.1 и 258.1 УК РФ» (<http://www.garant.ru/>).
2. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. М.: ООО «Бином-Пресс». 2008. 512 с.
3. Рожнов В. В., Лукаревский В. С., Сорокин П. А. Использование молекулярно-генетических характеристик при реинтродукции леопарда (*Panthera pardus* L., 1758) на Кавказе // Доклады академии наук, 2011, том 437, № 2, с. 280–285
4. Чубукова И.А. Data Mining. М.: Интернет-университет информационных технологий; Бином. Лаборатория знаний. 2008. 384 с.
5. Miththapala S., Seidensticker J., O'Brien S.J. Phylogeographic subspecies recognition in leopards (*Panthera pardus*): molecular genetic variation// Conservation Biology, 1996, v. 10, p. 1115–1132.
6. Uphyrkina O., Johnson W.E., Quigley A., Miquelle D., Marker L., Bush M., O'Brien S.J. Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus* // Molecular Ecology. 2001. V. 10. P. 2617–2633.