

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Горбунова Олега Григорьевича на диссертацию Вишневской Марии Сергеевны “Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа молекулярных маркеров”, представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности  
03.02.05 – энтомология

Актуальность темы диссертации не вызывает сомнений в связи с глобальной проблемой сохранения биологического разнообразия. Чёткую таксономическую детерминацию объекта разнообразия следует считать одной из основных задач для решения указанной проблемы.

Диссертационная работа Марии Сергеевны Вишневской представляет собой основательное исследование морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *P. admetus* с территории Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана и изучение возможности видовой идентификации с помощью морфологических признаков, а также хромосомных и молекулярных маркеров. Важным методологическим аспектом работы является комплексный подход для достижения поставленной цели, при котором анализировались не только классические морфологические признаки организменного уровня, но и признаки внутриклеточного и даже макромолекулярного уровня. Настоящий подход открывает путь для выявления наиболее глубоких, а отсюда и более естественных как внутри-, так и межвидовых взаимоотношений между исследуемыми таксонами. Таким образом, поставленная в диссертации цель является в высшей степени актуальной, а используемый диссертантом методологический подход соответствует задачам настоящего исследования.

В работе впервые детально изучена фауна комплекса мономорфных видов подрода *Agrodiaetus*. Впервые получены нуклеотидные последовательности по участку гена *COI* и ядерному маркеру *ITS2* для таксонов подрода *Agrodiaetus*, обитающих на территории Балканского полуострова, Азербайджана и Ирана. Эти данные позволили реконструировать филогенетические отношения в группе *Polyommatus (Agrodiaetus) admetus*. При помощи анализа молекулярных и цитогенетических маркеров обнаружены виды-двойники: *P. pseudorjabovi/P. rjabovianus/P. valiabadi*, *P. timfristos/P. aroaniensis* и *P. admetus/P. yeranyani*. Уточнены ареалы некоторых таксонов и описаны два новых для науки вида и один подвид. Впервые особенности окраски крыльев представлены в виде семи типов, соответствующих конкретным таксонам *Agrodiaetus*.

Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и 2 приложений. Основная часть изложена на 129 страницах и содержит 7 таблиц и 24 рисунка.

Во Введении (с. 4–14), которое автор разделила на 10 разделов, рассматривается актуальность диссертационной темы, ставится цель исследования и задачи, необходимые для достижения поставленной цели (всего 6). Кроме этого, здесь отдельно представлены

научная новизна, теоретическая и практическая значимость и методы исследования, апробация и публикации, а также благодарности коллегам и всем тем лицам, которые оказали посильную помощь диссертанту. Здесь также декларируются положения, выносимые на защиту. Всего их пять.

В первой главе диссертации (с. 15–27), которая разделяется на четыре части, изложена история изучения мономорфного комплекса видов “*admetus*” подрода *Agrodiaetus* рода *Polyommatus*. С конца 18 и до середины 20 века на основе изучения исключительно морфологических признаков в исследуемом комплексе мономорфных видов было описано всего три вида: *P. admetus* (Esper, 1783), *P. ripartii* (Freyer, 1830) и *P. rjabovi* (Forster, 1960). С середины 20 века к анализу морфологических признаков добавляется анализ кариотипов, который позволил установить, что число хромосом обычно стабильно внутри и дифференцировано между видами, представляя собой надёжный признак для разделения видов. В конце двадцатого – начале двадцать первого столетия для выявления родственных отношений между таксонами у разных групп организмов систематики начали широко применять методы, основанные на сравнении нуклеотидных замен в отдельных генах или фрагментах генов. Этот метод начал применяться и для изучения мономорфного комплекса видов “*admetus*”, но только к западноевропейской фауне. В заключительном разделе главы обсуждаются вопросы видовой диагностики с использованием анализа коротких фрагментов митохондриального гена цитохром оксидазы I (*COI*). Этот метод называется ДНК-баркодингом или ДНК-штрихкодированием. Здесь диссертантом рассмотрены аргументы за и против использования этого метода в систематике.

Вторая глава (с. 28–44) посвящена изученным материалам и методам, используемым для достижения поставленной цели диссертации. Глава разделена на два раздела. В разделе о материале указано, что был использован коллекционный материал, который хранится в сухом виде и в спирту в отделении Кариосистематики Зоологического института РАН. Собран он был в Греции, Болгарии, России, Азербайджане и Иране. Далее в отдельных подразделах диссертант последовательно и детально описывает методику исследований крылового рисунка, кариотипов, секвенирования и филогенетического анализа.

В третьей главе (“Морфология имаго: типы крылового рисунка” (с. 45–52) рассмотрены особенности окраски крыльев мономорфного комплекса видов “*admetus*”. Как известно, мономорфные виды подрода *Agrodiaetus* практически не различимы окраской верхней стороны крыльев. Что касается испода крыльев, то между таксонами и популяциями существуют небольшие различия, которые позволили диссертанту выделить семь типов крылового рисунка.

В четвёртой главе (с. 53–65) диссертации представлены результаты проведённого анализа хромосомного разнообразия. Показано, что подавляющее большинство изученных видов семейства *Lysaenidae* имеет стабильное хромосомное число, в гаплоидном наборе равное  $n=23-24$ . Особенностью представителей подрода *Agrodiaetus* является чрезвычайно высокий уровень межвидовых различий в хромосомных числах. На основе подробного исследования всех имеющихся литературных данных по кариотипам представителей подрода *Agrodiaetus*, диссертанту удалось выяснить, что представителям комплекса мономорфных видов соответствует значительный разброс в количестве хромосом в гаплоидном наборе: от 19 до 90.

Глава 5 “Анализ молекулярных маркеров” (с. 66–82) разделена на два раздела. В первом из них анализируются филогенетические реконструкции, полученные в результате Байесова анализа (BI) фрагмента *COI* длиной 657 п.н., а также анализов, проведённых с использованием метода максимального правдоподобия (ML) и метода максимальной парсимонии (MP). На реконструкции чётко выделяются две крупные клады – *P. admetus* и *P. dolus*, что полностью согласуется с данным, полученным ранее другими авторами.

С другой стороны, ядерный маркер *ITS2* в целом продемонстрировал низкую межвидовую изменчивость. Поэтому, как показал диссертант, реконструкции на основе одного этого маркера имели низкую поддержку и содержали большое число неразрешённых по-

литомий. Тем не менее, матрица *ITS2* содержала парсимониально информативные сайты, что позволило объединить данные по фрагментам маркеров *COI* и *ITS2* и построить конкатенированное дерево на основе данных по обоим маркерам. Для этого диссертантом были использованы 75 образцов, для которых были известны последовательности по обоим маркерам. Байесово дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей, имело такую же топологию, что и дерево, построенное по гену *COI*, однако, некоторые клады имели более высокие значения поддержки.

Второй раздел пятой главы посвящён анализу медианной сети взаимоотношений между видами клад *P. admetus* и *P. dolus*, построенной на базе фрагмента гена *COI*. Результаты анализа медианной сети совпадают с результатами анализа филогенетических деревьев, что говорит об адекватности выбранных методик настоящего исследования.

Заключительная глава 6 “Видовая идентификация, делимитация видов и классификация группы” (с. 83–106) разделена на шесть разделов. В первом разделе диссертант картировал типы окраски заднего крыла на филогенетическую схему, построенную методом Байесова анализа. В результате было установлено, что только один тип рисунка является видоспецифичным: это тип 3, характерный для *P. admetus*. Остальные типы рисунка крыльев были характерны для двух и более таксонов. Таким образом, диссертантом было установлено, что признаки крылового рисунка недостаточны для делимитации видов внутри изучаемого комплекса мономорфных видов линии *Polyommatus admetus*.

Во втором разделе главы диссертант картировал данные по хромосомным числам на филогенетические деревья, построенные различными методами (BI, MP и ML), а также на медианную сеть и на конкатенированное дерево. Показано, что практически все хромосомные кластеры соответствовали молекулярным кластерам. Однако были исключения. Некоторым молекулярным кластерам, представляющим виды, различающиеся по морфологии и по фрагменту гена *COI*, соответствовали одинаковые хромосомные числа. Из этого следует, что анализ кариотипов не всегда достаточен для идентификации видов.

В третьем разделе главы рассмотрен вопрос видоспецифичности фрагмента *COI*. В результате установлено, что, несмотря на низкий уровень межвидовой дифференциации по гену *COI* (менее трёх процентов) и низкий уровень внутривидовой изменчивости, анализ фрагмента гена *COI* показал его видоспецифичность и возможность использовать ДНК-баркоды для определения видов.

В четвёртом разделе диссертант рассматривает два примера взаимосвязей между характером окраски, молекулярных и хромосомных данных, обнаруженных у таксонов, встречающихся симпатрично. В первом случае на примере талышских популяций, обычно определяемых систематиками как *P. rjabovianus*, но совершенно различных по баркоду и количеству хромосом, делается вывод о том, что данные кластеры представляют два разных вида, а не случай внутривидовой изменчивости. Один из этих видов – ранее описанный *P. rjabovianus*. Второй вид, криптический по отношению к *P. rjabovianus*, был описан как новый для науки вид *P. pseudorjabovi*. Причинами такой ситуации диссертант указывает то, что разные кариотипы сопровождалась разными митохондриальными гаплогруппами, то есть существует неравновесное сцепление между этими физически несвязанными маркерами, а также отсутствием хромосомных гетерозигот.

Второй пример вышеотмеченных взаимосвязей касается анализа для вида *P. ripartii* в Европе, где популяции совершенно идентичны морфологически и по количеству хромосом, но резко кластеризуются по гену *COI*. Причиной этому диссертант видит вторичное соединение ранее разъединённых популяций после исчезновения барьера.

Пятый раздел главы представляет собой анализ молекулярных и хромосомных кластеров, обнаруженных в аллопатрии. Здесь на примере *P. admetus* показано, что существенные различия в последовательности гена *COI*, а также разница в количестве хромосом, связанные с географическим распространением, говорят о наличии невыявленных видов, то есть *P. admetus* s. aust., вероятнее всего, состоит из двух аллопатрических видов, *P. admetus* s. str. и *P. yeranyani*, подвидом которого является таксон *P. yeranyani malyevi*. Да-

лее диссертант приводит пример с *P. rjabovianus*, который ранее считался подвидом *P. valiabadi* из-за их внешнего сходства и аллопатрического распространения (*P. valiabadi* обитает на территории Северного Ирана, а *P. rjabovianus* на территории Азербайджана). При исследовании был обнаружен высокий уровень генетической дифференциации между *P. valiabadi* и *P. rjabovianus*. Кариотипы данных таксонов также сильно различаются: для *P. valiabadi* хромосомное число равно  $n = 23$ , а для *P. rjabovianus* и *P. rjabovianus masul*  $n = 49$  и  $43$  соответственно. Разница между *P. rjabovianus* и *P. valiabadi* слишком высока, чтобы считать их популяциями одного вида. На дереве оба таксона образуют самостоятельные сестринские клады с высокой поддержкой.

В заключительном разделе главы рассмотрены вопросы альтернативных классификаций. Здесь на конкретных примерах диссертант разбирает случаи различных интерпретаций спорных классификаций, основанных на различных концепциях вида (биологической и филогенетической). Главу заключает сравнительная таблица классификации группы *P. dolus*, предложенная с использованием филогенетической и биологической (политипической) концепций вида, а также таблица классификации группы *P. admetus*, для которой обе классификации – как основанная на филогенетической концепции вида, так и основанная на политипической концепции вида – одинаковы.

В Заключении (с. 105–106) диссертант напоминает о сложностях, возникающих при решении таксономических задач внутри мономорфного комплекса видов линии *Polyommatus (Agrodiaetus) admetus*. Преодоление этих сложностей возможно при использовании совокупности признаков – данные по кариотипам, данные молекулярных исследований, морфологию (типы крылового рисунка), а также данные по распространению и местам обитания (симпатрия/аллопатрия). Только при учёте всех этих параметров, по мнению диссертанта, возникает возможность выдвигать гипотезы о таксономическом положении исследуемых экземпляров.

Завершают диссертацию Выводы (с. 107–108), имеющие отчасти реферативный характер и чётко излагающие её основные положения. Список цитируемой литературы (с. 109–129) включает 149 названий (из которых 140 иностранных), что позволяет высоко оценить уровень знания диссертантом изучаемой проблематики. В Приложения 1 и 2 вынесены дополнительные филогенетические деревья и описания видов, выявленных в ходе исследования.

Автореферат полностью соответствует тексту диссертации.

Незначительным замечанием, которое, однако, ни в коем случае не влияет на ценность данного исследования, является получение цифровых изображений рисунка крыльев. Из текста диссертации (с. 37) мы видим, что часть бабочек была отсканирована на сканере Epson Perfection 4870 photo, а другая часть бабочек была сфотографирована с помощью фотоаппарата Nikon D600 (объектив Nikon AF-S VR Micro-NIKKOR 105mm). Мне представляется, что для анализа изображений лучше было бы использовать файлы, полученные во всех случаях по одной и той же методике.

Диссертационное исследование Вишневской М.С. “Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа молекулярных маркеров” обладает внутренним единством, написана хорошим научным языком и является самостоятельным исследованием, имеющим научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Выводы соответствуют цели и задачам исследования. Работа выполнена автором самостоятельно на высоком научном уровне и соответствует требованиям ВАК РФ о полноте изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем научной степени, о выполнении требований к публикации основных научных результатов диссертации, предусмотренных пунктами 11 и 13, выполнена с соблюдением требований пункта 14 Положения о присуждении учёных степеней (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.).

Вышеизложенное позволяет считать, что диссертационная работа Вишневской М.С. по своему содержанию, полноте и достоверности полученных результатов, значимости теоретических выводов и практических результатов соответствует пункту 9 указанного выше Положения о присуждении учёных степеней, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология.

Официальный оппонент  
доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник  
ФГБУН ИПЭЭ им. А.Н. Северцова  
Российской академии наук

Олег Григорьевич Горбунов

ФГБУН Института проблем экологии и  
эволюции им. А.Н. Северцова  
Российской академии наук  
119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом. 33  
e-mail: gorbunov.oleg@mail.ru  
тел. (495) 954-75-53

С научными публикациями О.Г. Горбунова можно ознакомиться на странице Интеллектуальной Системы Тематического Исследования Наукометрических данных (ИСТИНА): <http://istina.msu.ru/profile/GorbunovOG/>, научной электронной библиотеки: <http://elibrary.ru> и на сайтах научных журналов.

Подпись О.Г. Горбунова удостоверяю

