

ОТЗЫВ

официального оппонента

профессора, доктора биологических наук, профессора кафедры морфологии и экологии животных Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского» Аникина Василия Викторовича на диссертацию Вишневской Марии Сергеевны «Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lysaenidae) на основе анализа молекулярных маркеров», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология в диссертационный совет Д 002.223.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 1.

Диссертация Вишневской Марии Сергеевны представляет собой целенаправленное исследование морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *Polyommatus admetus* с территории Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана.

Тема диссертации очень **актуальна** в силу недостаточности и фрагментарности современных данных по нуклеотидным последовательностям гена *COI* и некодирующего спейсера *ITS2* для большинства таксонов, обитающих на территории Балканского полуострова и Передней Азии.

Поставленная диссертантом **цель работы** – исследование морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *P. admetus* с территории Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана с таксономической интерпретацией полученных данных и изучением возможности видовой идентификации с помощью морфологических признаков, а также хромосомных и молекулярных маркеров, была в полной мере достигнута автором благодаря решению хорошо скоординированных и **четко поставленных задач** работы.

Так, было изучено разнообразие крылового рисунка и выявлены его элементы, которые можно использовать для делимитации видов и популяций; сделаны анализ всех имеющихся в литературе данных по кариотипам и картирование хромосомных данных на молекулярные деревья; установлены митохондриальные гаплогруппы и проведен анализ родственных связей между популяциями, хромосомными расами и видами, основанный на методах молекулярной филогенетики; проверена гипотеза о существовании симпатрично обитающих хромосомных рас, как репродуктивно изолированных биологических видов; осуществлена таксономическая интерпретация обнаруженного морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в рамках концепций биологического и филогенетического вида; дана оценка применимости ДНК-баркодов для видовой диагностики чешуекрылых.

Научная новизна диссертации заключается в детальной изученности фауны комплекса мономорфных видов подрода *Agrodiaetus* исследованного региона. Впервые были установлены нуклеотидные последовательности по участку гена *COI* и ядерному маркеру *ITS2* для таксонов подрода *Agrodiaetus*, обитающих в регионе, что, в свою очередь, позволило реконструировать филогенетические отношения в группе *Polyommatus (Agrodiaetus) admetus*. Проведенный анализ молекулярных и цитогенетических маркеров позволил обнаружить виды-двойники: *P. pseudorjabovi* / *P. rjabovianus* / *P. valiabadi*, *P. timfristos* / *P. aroaniensis* и *P. admetus* / *P. yeranyani*. Описаны два новых для науки вида и один подвид, а особенности окраски крыльев представлены в виде семи «типов», соответствующих определённым таксонам *Agrodiaetus*.

Теоретическая и практическая ценность работы заключается в использовании полученных данных для систематики и филогении представителей комплекса *Polyommatus admetus*. Полученные авторские результаты значительно дополняют накопленные сведения по нуклеотидным последовательностям участка гена *COI*, а также ядерной некодирующей последовательности *ITS2* данного подрода голубянок, которые в дальнейшем с успехом могут быть использованы для разработки системы всего семейства *Lycaenidae*. Исследованные виды голубянок подрода *Agrodiaetus* являются модельным объектом по изучению механизмов видообразования. Разработанные с использованием этой группы методы делимитации видов (на основе молекулярных и цитогенетических маркеров) могут быть использованы для анализа биологического разнообразия других групп животных и растений. Уникальность точечных ареалов у видов подрода *Agrodiaetus* свидетельствует о необходимости отнесения популяций этих таксонов к категории охраняемых живых объектов. Полученные авторские результаты работы могут быть также использованы в образовательных курсах на сохранившихся кафедрах энтомологии и зоологии беспозвоночных различных вузов РФ.

По результатам исследований были сделаны доклады в 2008-2017 гг. на 8 конференциях регионального, всероссийского и международного уровней. Участие в конференциях и выступления с результатами диссертационной работы подтверждают, что основные результаты исследований Вишневской М.С. были в полной мере апробированы.

Диссертация Марии Сергеевны написана по традиционному плану и структурно состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и 2 приложений (дополнительные филогенетические реконструкции – 6 иллюстраций и видовые описания с одной иллюстрацией). Основное содержание работы изложено на 129 страницах, включая 24 рисунка и 7 таблиц по тексту. Список цитированной литературы включает 149 источников, из них 140 на иностранных языках. Общий объем работы составляет 144 страницы.

По теме диссертации опубликованы 12 печатных работ, 3 из которых – в изданиях из списка ВАК РФ.

Методическое обеспечение проведенного исследования вполне достаточно для достоверности полученных результатов. Диссертантом были использованы современные методы молекулярной биологии по выделению

ДНК, ПЦР со специфичными праймерами по фрагменту гена *COI* и спейсера *ITS2*, очистке проб для секвенирования, и само секвенирование. Для филогенетического анализа были использованы специальные программы, позволяющие производить выравнивание последовательностей, построение филогенетических деревьев и сетей. Все представленные положения автором в полной мере доказаны в тексте самой диссертации и закреплены в соответствующих выводах.

Автор принимал активное участие на всех этапах изучения комплекса мономорфных видов на протяжении 10 лет (организация и сбор полевого материала, проведение лабораторных экспериментов, обработка полученных сиквенсов, построение всех филогенетических реконструкций и медианных сетей, анализ полученных реконструкций и сетей, поиск и анализ всех литературных данных по хромосомным числам исследуемой группы; представление результатов на конференциях, написание и публикация статей и монографии, подготовка рукописи диссертации) свидетельствует о высоких показателях **личного вклада Марии Сергеевны** в заявленное диссертационное исследование.

Кратко остановимся на содержании глав диссертационной работы.

Во **Введении** обосновываются актуальность исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, апробация работы, объем и структура диссертации. Цель сформулирована четко и ясно. Задачи соответствуют поставленным целям. Заявлены положения (5) выносимые на защиту работы.

В целом – эта вводная часть диссертации представляет собой повторение одноименных блоков автореферата.

Глава 1 (на 13 страницах) посвящена истории изучения комплекса мономорфных видов из линии *Polyommatus admetus*. В подглавах 1-4 проведен ретроспективный анализ работ, связанных с изучением комплекса, основанным на исследовании морфологии бабочек, их хромосом, молекулярных маркеров, видовой диагностики при помощи митохондриальных ДНК-баркодов. В каждом подразделе приведены результаты исследований и их положительные и отрицательные «стороны» в видовой диагностике внутри комплекса. Диссертантом подчеркивается, что значительная часть публикаций направлена на изучение западноевропейской фауны, в то время как фауна Балканского полуострова и Передней Азии остаётся мало исследованной.

Глава 2 (на 17 стр.) представляет собой обзор исследованного материала, использованных методов работы и анализа полученных данных. Для работы был задействован коллекционный материал (из отделения Кариосистематики Зоологического института РАН) сборов за период с 2002 по 2016 год из типовых мест обитания изученных таксонов голубянок.

Из методов исследования автором применялись как традиционные методы исследования в энтомологии – анализ рисунка крыльев, анализ кариотипов, так и современные молекулярные по баркодингу – пробоподготовка, выделение ДНК, амплификация ДНК, секвенирование, филогенетический ана-

лиз. Вся молекулярная часть исследований проводилась автором в специализированных лабораториях на базе РЦ «Хромас» Научный парк СПбГУ, «Лаборатории генетики животных» Биологического факультета СПбГУ, в РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Всего автором самостоятельно было получено 155 новых сиквенсов – 78 по гену *COI* и 77 по спейсеру *ITS2*.

Таким образом, все используемые Вишневецкой М.С. в исследованиях методы общеприняты, апробированы и не вызывают сомнения. Все вышеизложенное позволяет считать **методическое обеспечение** данного исследования **вполне достаточным**, чтобы **достоверно** оценить полученные результаты, обосновать научные положения и выводы диссертации.

Глава 3 (на 8 стр.) знакомит читателя с морфологией имаго, а именно с типами крылового рисунка. Здесь автор выделяет семь типов с их характерными деталями рисунка и особенностями для видов этого подрода. Это: тип *Polyommatus ripartii*, характерен для *P. orphicus orphicus*, *P. orphicus eleniae*, *P. nephohiptamenos*, *P. ripartii pelopi* и *P. timfristos*; тип *Polyommatus valiabadi*, характерен для *P. valiabadi*, *P. rjabovianus* и *P. pseudorjabovi*; тип *Polyommatus admetus*, характерен для *P. admetus*; тип *Polyommatus nephohiptamenos*, характерен для *P. nephohiptamenos*, *P. ripartii*, *P. orphicus orphicus* и *P. timfristos*; тип *Polyommatus humedasaе*, характерен для *P. aroaniensis*, *P. timfristos*, *P. orphicus*, *P. ripartii* из Западной Европы (но не с Балканского полуострова); тип *Polyommatus aroaniensis*, характерен для *P. aroaniensis*, *P. timfristos*, *P. orphicus orphicus*, *P. orphicus eleniae*, *P. ripartii* из Крыма; тип *Polyommatus orphicus*, характерен для *P. orphicus orphicus*, здесь автор указывает на особенность этого типа – белый постдискальный штрих на переднем крыле, который может встречаться и у *P. aroaniensis* с *P. nephohiptamenos*.

Глава 4 (на 13 стр.) представляет собой анализ хромосомного разнообразия представителей мономорфного комплекса видов подрода *Agrodiaetus*. Голубянки этой группы имеют чрезвычайно высокий уровень межвидовых различий в хромосомных числах, и автору было важным установить хромосомные числа в гаплоидном наборе для каждого мономорфного вида. Автор установил видовые отличия в хромосомных числах, что позволило ему использовать эти результаты для последующего сравнения с данными филогенетического анализа на основе сиквенсов по этим же видам. Уже в 6-й Главе это позволило сделать автору вывод, что в исследуемой группе голубянок хромосомные числа не обладают достаточной разрешающей способностью для делимитации таксонов.

В свою очередь, проводимая авторская линия исследований подчеркивает логичность хода проводимых изысканий, их ступенчатость для достижения намеченной научной цели диссертации.

Глава 5 (на 17 стр.) одна из центральных глав диссертации, которая отражает смысл названия работы и цель исследований. Представляет собой анализ молекулярных маркеров. Так, на основе анализа фрагмента *COI* длиной 657 п.н. с использованием методов BI, ML и MP автор «получил» фило-

граммы с высокими значениями апостериорной вероятности (для метода BI) и бутстреп-поддержек (для методов ML и MP) для большинства кластеров, которые группируются в две клады – *P. admetus* и *P. dolus*, что соответствует литературным данным западных коллег. Проведенный анализ по ядерному маркеру *ITS2* показал низкую межвидовую изменчивость, что потребовало от автора объединить данные по фрагментам маркеров *COI* и *ITS2* для построения конкатенированного дерева. Общая длина объединённого выравнивания составила 1039 п. н., и Байесово дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей, имело такую же топологию, что и дерево, построенное по маркеру *COI*. Тем не менее, некоторые клады имели более высокие значения поддержки, а *P. orphicus orphicus* + *P. orphicus eleniae* образовали монофилетическую линию, со значением постериорной вероятности 77, что позволяет несколько иначе воспринимать соотношение и расположение клад по видам.

Использование другого метода – построение медианной сети гаплотипов на базе фрагмента гена *COI* (для 191 образца), позволило диссертанту «установить» 96 гаплотипов и 26 гаплогрупп: 10 гаплогрупп в кладе *P. admetus* и 16 гаплогрупп в кладе *P. dolus*. Как показал анализ филогенетической сети, полученные результаты совпадают с данными анализа филогенетических деревьев. Каждый раздел в главе имеет текстовое подтверждение в виде представленных табличных результатов и графических изображений на рисунках.

В **Главе 6** (на 21 стр.) автор представляет видовую идентификацию, делимитацию и классификацию группы, что в целом подводит итог всей работе и является главной ее результирующей. Её содержание подчеркивает необходимость для современных систематических работ в энтомологии картирования морфологических и хромосомных данных на молекулярную филогению, проведения анализа молекулярных и хромосомных кластеров, обнаруженных в симпатрии и отдельно в аллопатрии, что позволяет не просто «создавать» новые альтернативные классификации таксонов, а выходить на новый уровень понятия концепции вида – биолого-филогенетический. Это, по мнению рецензента, представляется самым значимым научным достижением теоретической составляющей представленной работы! Весь представленный материал в главе и его анализ «делает» её самой интересной и научно «красивой» во всей диссертации.

И хотя автор «уходит» от представления единой системы рассматриваемого таксона для группы *P. dolus* и предлагает два варианта классификации (табл. 6, стр. 102-103), а для группы *P. admetus* – один (табл. 7, стр. 104), делается важное заключение. Различия в числах хромосом не обязательно приводят к полной репродуктивной изоляции, и в некоторых случаях не препятствуют межвидовой гибридизации и генетической интрогрессии (Lukhtanov et al., 2015), и тогда данную группу таксонов можно рассматривать как один вид с несколькими подвидами, каждый из которых имеет уникальный кариотип. Каждый раздел в главе имеет текстовое подтверждение в виде представленных табличных результатов и графических изображений на рисунках.

Завершают работу **Заключение** (на 2 стр.) и 7 **Выводов** (на 2 стр.). Все выводы корректны и соответствуют цели и поставленным задачам исследования. Список литературы обширен и представлен на 98% иностранными источниками. При этом в списке имеется много современных работ последних пяти лет по тематике исследований, включая и авторские публикации.

В целом, диссертационную работу Вишневецкой М.С. следует охарактеризовать положительно, а диссертанта – как современного ученого лепидоптеролога, вдумчивого, внимательного и широко эрудированного энтомолога-исследователя в области таксономии, молекулярной систематики, филогенетики, видообразования.

Однако диссертация не лишена определенных недочетов. Так:

1. Есть некоторые недочеты в оформлении текста и представления материала диссертации, замечания идут в порядке повествования текста и они следующего плана:

а) таблицу № 1 (стр. 31-36) следовало поместить в Приложение, т.к. это первичные данные и представляют собой список образцов, которые подтверждают наличие материала, и в самом тексте диссертации эти сведения не обсуждаются;

б) такое же замечание относится и к таблице № 4 (стр. 78-82);

в) на рисунках – № 5 (стр. 47), № 6 (стр. 48), № 7 (стр. 49), № 8 (стр. 50), № 9 (стр. 51), № 10 (стр. 61), № 11 (стр. 62), № 12 (стр. 63), № 13 (стр. 64) размер шрифта буквенных условных обозначений номеров образцов и т.п. превышает размер шрифта подрисовочной подписи;

г) на рисунках № 14 (стр. 69), № 15 (стр. 70), № 19 (стр. 75) и на других филогенетических реконструкциях написание групп по кластерам следовало давать на русском языке, а не в английском написании, т.е. «группа *admetus*» вместо «*admetus group*» и т.д. В случае «невозможности» внесения русского названия группы в обозначения при программном анализе (программа не воспринимает русский язык) автору следовало уже в ручном режиме «рисования» исправить эти подписи в «доковском» документе;

д) в научных квалификационных работах не допускается наличие «пустых» страниц текста с одной строкой, если это не конец главы. В тексте диссертации есть несколько таких страниц – стр. 60 и стр. 68. На каждой из них нужно было «подтянуть» текст со следующей страницы и тем самым заполнить пустое пространство. Текст диссертации (в виде рисунков) на следующей странице позволял это сделать;

2. Теперь перейдем к научным замечаниям по тексту диссертации.

а) во **Введении** в целях работы (стр. 8) указывается, что работа направлена на «... исследование морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *P. admetus* ...», что собственно было отражено в диссертации выполненными блоками в виде Главы № 3, Главы № 4 и Главы № 5. Однако в названии самой работы вынесено «Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок

подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа молекулярных маркеров». Молекулярному анализу посвящены только Глава № 5 и частично Глава № 6. Формат примененных методов исследований по морфологии, кариологии, молекулярному анализу подразумевает другое «расширенное» название диссертационной работы без её второй части («... на основе анализа молекулярных маркеров»);

б) в Положениях № 1 и № 2 следовало четко указать, исследование каких именно таксонов было осуществлено, иначе не понятно, относится ли высказывания ко всем *Polyommatus* или только к *Agrodiaetus*;

в) Положение № 2 (стр. 11) – его вторая часть «... так как одинаковые хромосомные числа ...» – «лишнее», т.к. это есть не что иное, как доказательная часть самого выносимого заявления;

г) в определенной мере предыдущее замечание можно отнести и к Положениям № 4. «Эти виды в значительной части ...» – представляет собой доказательную базу положения, что, в свою очередь, должно было представлено в выводах по заявленному положению;

д) рассматривая доказательную базу представленных положений в выводах диссертации, мы сразу для проверки обращаемся к Выводам (стр. 107), где Выводы № 1 - № 2 и № 5 - № 6 – это точное «воспроизведение» самих Положений № 1-4! Это вызывает некоторое недоумение, т.к. Выводы должны представлять собой доказательную часть заявленных положений, т.е. идентичность положений и выводов в научных работах недопустима;

е) в Главе № 1 (на стр. 24, 1 строка 1 абзаца) цитируется канадский автор Пол Эберт и в скобках указывается его написание на английском и год выхода в свет самих работ. Если мы обратимся к списку литературы, то мы увидим, что это коллективная работа, и диссертанту следовало добавить в скобках – «et al.», это относится и к его другой работе 2004 года, цитируемой в следующем абзаце:

ж) в этом же абзаце указывается название гена, где «С» отмечена курсивом, а субъединица цифрой – «1», т.е. не курсивом и не римской цифрой «I»? Присутствует некоторая терминологическая путаница;

з) здесь же (в этом абзаце) автор «опускает» информацию о том, где эти 648 п.о. располагаются – в 5'-конце гена, а это принципиально важно, и это замечание будет отмечено оппонентом (далее) и для другой части текста диссертации, где уже будут рассматриваться авторские наработки по синтезу «новых» праймеров под объекты исследований;

и) на этой же странице (стр. 24) в последнем абзаце указана ссылка на проект – <http://www.barcodeoflife.org>, который с конца 2011 – начала 2012 года имеет совершенно другую ссылку - <http://www.boldsystems.org>, и автору следовало указать современные названия проекта и ссылку;

к) на стр. 25 во втором абзаце присутствует определенная мелкая путаница – «... представляет собой разницу между внутривидовой и межвидовой генетическими дистанциями, выраженными в процентах ...» – с математической точки зрения при такой формуле «мы» всегда должны иметь отрица-

тельные значения процентов. Здесь требуется разъяснения автора по более точной формулировке различий;

л) на стр. 26 в пункте № 2 присутствует другая путаница – *r*-дистанция выражена в процентах. При этом на стр. 27 автором приведено точное определение в сноске «1», что *r*-дистанция это доля!;

м) в **Главе № 2** в разделе 2.1 не указано количество экземпляров видов, которые были привлечены для морфологической части работы и какова была выборка по каждому виду, чтобы можно было «суммировать» рисунки испода крыла в определенные типы?;

н) на стр. 38 в **разделе № 2.2.3.2.1** автором указывается, что «Для амплификации фрагмента гена *COI* были использованы специфичные праймеры, разработанные специально для данного исследования». Однако автор не указывает, как рассчитывались эти праймеры и насколько сопоставимы получаемые ПЦР-продукты и сиквенсы с имеющимися сравниваемыми данными из Ген-банка? Ни в методике ни в результатах нет информации о том, с какой по какую нуклеотидную позицию в гене *COI* был амплифицирован/отсеквенирован (с помощью новых праймеров) и наконец изучен ПЦР-продукт. Требуется пояснения автора;

о) на стр. 42 отсутствуют ссылки на методы ML, MP, BI.

п) автор никак не объясняет, почему «повсеместно» в работе используется для оценки генетических дистанций самая простая модель – *r*-дистанция? В проекте «Barcoding of Life» уже давно в качестве универсальной модели расчета генетических дистанций, в частности для отображения дистантных дендрограмм родственных связей, в разделе «Tree based identification» применяется куда более сложный алгоритм «Kimura-2-parameter», учитывающий число транзиций и трансверсий. Уверен ли автор, что результаты расчета генетических дистанций с использованием методов *r*-дистанции и «Kimura-2-parameter» между собой коррелируют?;

р) **Вывод № 7** (стр. 108) является по своей сути рассуждением.

Других замечаний у рецензента нет, и он уверен, что на все сделанные по тексту диссертации замечания сможет получить от автора правомерные и разъясняющие ответы. Поставленные вопросы и сделанные замечания не снижают научной ценности проведенной диссертантом работы.

Таким образом, диссертационная работа Вишневецкой М. С. представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне. Она хорошо оформлена, иллюстрирована достаточным объемом рисунков и таблиц и оставляет очень хорошее впечатление. В Приложении даны дополнительные филогенетические реконструкции (6 иллюстраций) и видовые описания (с одной иллюстрацией) исследованных и установленных таксонов. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертационной работы, публикации в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Заключение. Автореферат и 12 публикаций, из которых 3 статьи в изданиях из списка ВАК РФ, посвященные изучению морфологического,

сомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *Polyommatus admetus*, разработке систематики и филогении бабочек подрода *Agrodiaetus*, полностью отражают содержание диссертации. Диссертация «Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа молекулярных маркеров» выполнена на хорошем научном и методическом уровнях, отвечает паспорту специальности 03.02.05 – Энтомология и соответствует требованиям пп. 9–11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, а соискатель Вишневская Мария Сергеевна успешно представила законченное научное исследование, имеющее значительный элемент новизны, и заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.05 – Энтомология.

Аникин Василий Викторович
доктор биологических наук (03.02.05 – Энтомология),
профессор, профессор кафедры морфологии
и экологии животных ФГБОУ ВО «Саратовский
национальный исследовательский
государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»,
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 5
Биологический факультет, тел:+7 (8452) 51-16-30
AnikinVasiliiV@mail.ru


10.09.2018г.

