



«УТВЕРЖДАЮ»

В.В. Глупов

(Ф.И.О. директора, заместителя)

«28» августа 2018 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук»

на диссертацию Вишневской Марии Сергеевны

«Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа молекулярных маркёров», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.05 – энтомология в диссертационный совет Д 002.223.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт Российской академии наук» по адресу: 1999034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 1.

Диссертация Вишневской Марии Сергеевны представляет оригинальную попытку использования комплекса морфологических, цитогенетических и молекулярных методов для делимитации видов бабочек-голубянок мономорфной группы *admetus* подрода *Agrodiaetus* рода *Polyommatus* семейства Lycaenidae (Insecta, Lepidoptera). Такой комплексный подход к решению актуальной научной проблемы выявления видов-двойников требует выбора адекватной модели и владения различными методами сравнительного анализа. Знакомство с диссертационным исследованием показывает, что обе эти стратегии были реализованы для достижения цели исследования и решения поставленных задач. Особый акцент в работе был сделан на анализе молекулярных маркёров, что нашло отражение в названии рукописи диссертации. Использование методов, основанных на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей, недавно, но стремительно вошло в практику таксономических и филогенетических исследований, поскольку они позволяют оценить уровень дивергенции видов в таксоне любого иерархического ранга. Существенно отметить также, что в эволюции нуклеотидных последовательностей маловероятны конвергенции, параллелизмы и реверсии. Наиболее часто используемым маркёром для систематики и филогении является нуклеотидная последовательность генов первой субъединицы цитохрома оксидазы (*COI*). Наряду с этим, использование и других молекулярных маркёров способствует созданию более устойчивых филогенетических реконструкций и убедительных таксономических построений, что ещё раз подчёркивает актуальность предпринятого исследования.

В связи с этим нужно заметить, что **Название** диссертационного исследования не вполне корректно отражает суть работы, которая по спектру методических приёмов и полученных на их основе данных шире, чем «анализ молекулярных маркёров».

Диссертация Марии Сергеевны написана по традиционному плану и 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. Список литературы включает 149 наименований, из которых 9 на русском языке и 140 на иностранных языках. Приложения содержат дополнительные филогенетические реконструкции (6 иллюстраций) и видовые описания (с одной иллюстрацией). Общий объём диссертации с приложениями 144 страницы.



Во **Введении** автор чётко формулирует актуальность темы, цель и задачи исследования, новизну подходов к достижению поставленной цели. В этом же разделе взвешенно подчёркивается теоретическая и практическая значимость работы, обосновывается актуальность и научная новизна исследования, приводятся основные положения, выносимые на защиту диссертации. Здесь же отражена апробация работы, объём и структура диссертации. Анализ этого раздела диссертации позволяют сделать вывод, что поставленные задачи соответствуют поставленной цели, а результаты работы уже прошли основательную апробацию на международных и российских конференциях, отражены в публикациях.

**Глава 1** посвящена истории изучения комплекса мономорфных видов линии *Polyommatus admetus*. Результаты аналитического обзора литературы дают полное представление о современном состоянии исследования морфологии бабочек, о возможностях и перспективах цитогенетических и молекулярных методов в систематике и филогении чешуекрылых насекомых. Анализ литературы позволил автору убедительно обосновать оригинальность исследовательской цели, направленной на комплексный анализ морфологически, цитогенетических и молекулярных признаков у модельной группы насекомых. Этот подход выгодно отличает предпринятое исследование от большинства других, в которых решение о таксономической принадлежности той или иной группы принималось на основе анализа отдельных признаков.

**Глава 2** посвящена обзору материалов и методов, положенных в основу диссертационного исследования. Из этой главы видно, что для достижения поставленной цели была использована уникальная коллекция бабочек, которые были отловлены и хранились специально для предпринятого исследования. Большая часть использованного материала (10 таксонов) хранится в отделении Кариосистематики Зоологического института РАН, включающая сборы с Западного Алтая, Греции, Болгарии, Азербайджана и Ирана, включая материалы из типовых мест семи таксонов исследуемой группы видов. Рисунок крыльев был проанализирован у всех экземпляров, использованных в исследовании. Для анализа кариотипов, помимо собственных материалов, были использованы все доступные литературные данные по видам комплекса *P. admetus*. Подробно описаны методики исследования кариотипов и выбранных молекулярных маркёров. Отдельный раздел посвящён описанию протоколов анализа ДНК и статистической обработке молекулярных данных.

В этом разделе полно представлен весь арсенал методов необходимых и достаточных для достижения цели и решения задач исследования, обоснования научных положений и заключительных выводов диссертации.

В **Главе 3** анализируется крыловой рисунок группы мономорфных видов линии *P. admetus*. Соискателем впервые выделено семь типов крылового рисунка. Результаты анализа иллюстрированы фотографиями достаточного уровня разрешения. Проведённый скрупулёзный анализ не позволил выявить соответствие рисуночных морфотипов таксонам того или иного ранга (за исключением *P. admetus*), что отразилось в выводе о недостаточной информативности морфологических признаков для делиминации таксонов в исследованной группе бабочек.



**Глава 4** посвящена анализу кариотипов в исследуемой группе бабочек. Показано, что подавляющее большинство видов семейства *Lycaenidae* имеет консервативный тип хромосомного набора ( $n=23-24$ ). Однако в подроде *Agrodiaetus* уровень межвидовых различий в хромосомных числах очень высокий. Эта информация подтверждена фотографиями и краткими, но точными описаниями кариотипов исследуемых видов.

**Главе 5** отражает результаты анализа нуклеотидных последовательностей в митохондриальном гене *COI* и ядерном маркёре *ITS2*, а также опыт реконструкции филогенетических деревьев с использованием метода максимального правдоподобия и метода максимальной парсимонии. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей помещены в международный банк данных. Полученные филограммы построены корректно и обсуждаются в следующих разделах диссертации.

**Глава 6** представляет собой анализ всех полученных данных и на основе этого проводится видовая идентификация, делимитация видов и классификация группы. Крыловой рисунок только одного типа (*P. admetus*, тип 3) оказался видоспецифичным, остальные характерны для двух и более таксонов. Но хромосомные кластеры почти полностью соответствовали ДНК-молекулярным кластерам. В ряде случаев одно и то же гаплоидное число хромосом соответствовало разным видам, различающимся по морфологии и фрагменту гена *COI*, что может быть следствием как гомоплазии, (*P. fabressei* и *P. rippartii*) или наследованием признака от общего предка (*P. rippartii* и *P. nephohiptamenos*).

Межвидовая дифференциация по гену *COI* оказалась очень низкой, для 73 пар из 210 минимальное значение  $r$ -дистанции составила менее 3%, а для 8 пар – меньше 1%, хотя обычно должно быть более 3%. А для одной пары видов – *P. fabressei* и *P. fulgens* минимальное значение  $r$ -дистанции оказалось равным нулю, несмотря на чёткие различия в морфологии и в кариотипе. Это один из интересных результатов данного исследования. Другой важным результатом исследования является обнаружение новых видов (напр. *P. pseudorjabovi*) по молекулярным и хромосомным кластерам при их симпатрии с известными видами. Не менее интересно доказательство на основе молекулярных и цитогенетических данных видовой самостоятельности *P. yeranyani*, ранее включаемого в вид *P. admetus*, а также видовой принадлежности *P. rjabovianus*, который считался подвидом *P. valiabadi*. В отдельном разделе этой главы предлагается анализ возможности альтернативных классификаций, по сравнению с предложенной соискателем. При этом анализируются несколько комплексов видов: *P. rjabovianus/masul*, *P. timfristos/himedasae/aroaniensis/orphicus*, *P. alcestis/karacetinae/dantchenko/eriwanensis/interjectus*. Раздел заканчивается выводом, что «Не существует объективных критериев для выбора между этими двумя классификациями [филогенетической или политипической] в качестве единственной системы. В этой ситуации нам кажется целесообразным в качестве наиболее предпочтительной использовать ту систему, которая в наибольшей степени соответствует традиционным (общепринятым) представлениям об объёме видов в изучаемом комплексе», что представляется совершенно обоснованным.

В **Заключении** отмечено, что в таком таксономически сложном комплексе мноморфных видов линии *P. (Agrodiaetus) admetus* ни морфология, ни кариология не могут помочь правильно оценить видовую принадлежность того или иного экземпляра. Но работа соискателя показала, что для вынесения таксономических решений невозможно



опираться только и на данные молекулярных исследований. Поэтому важным заключением является то, что для полноценных выводов по таксономии необходимо использовать совокупность признаков – данные по кариотипам, данные молекулярных исследований, морфологию, а также данные по распространению и местам обитания (симпатрия/ аллопатрия). Только при учёте всех этих параметров можно выдвигать гипотезы о таксономическом положении исследуемых экземпляров.

Завершают работу 7 выводов. Все они корректны и соответствуют цели и поставленным задачам исследования. Список литературы обширен и содержит значительное количество источников (149), в значительной степени иностранных. При этом в списке имеется много (почти четверть от всего списка) источников последних пяти лет.

Поставленная диссертантом **Цель исследования**, ориентированная на сравнительный анализ морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов группы *Polyommatus admetus* (подрода *Agrodiaetus*) в полной мере достигнута автором. Этому способствовало решение чётко поставленных задач работы и наличие репрезентативных выборок из популяций бабочек с территории Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана. На пути решения исследовательских задач, соискателем проанализировано разнообразие рисунка крыла и выявлены те его элементы, которые потенциально можно использовать для разграничения (делимитации) видов и отдельных популяций. Соответствие цитогенетических и молекулярных данных позволило надёжно обосновать выделение кластеров мономорфных особей и на основе этого предложить оригинальную систему модельной группы бабочек.

**Научная новизна** диссертации заключается в детальном исследовании фауны мономорфных видов группы *admetus* подрода *Agrodiaetus* Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана. Соискателем впервые секвенированы нуклеотидные последовательности по участку гена *COI* и ядерному маркеру *ITS2* для таксонов видовой группы *admetus* подрода *Agrodiaetus*, обитающих на территории Балканского полуострова, Азербайджана и Ирана. Это позволило реконструировать филогенетические отношения в изученной группе *admetus*. При помощи анализа молекулярных и цитогенетических данных обнаружены виды-двойники: *P. pseudorjabovi*/*P. rjabovianus*/*P. valiabadi*, *P. timfristos*/*P. aroaniensis* и *P. admetus*/*P. yeranyani*. Уточнено распространение ряда таксонов группы *admetus* и описаны два новых для науки вида из этой группы и один подвид. Впервые разработана типизация особенностей окраски крыльев изученной группы бабочек-голубянок рода *Agrodiaetus*, которая представлена 7 типами, соответствующим описанным таксонам.

**Теоретическая и практическая ценность** работы заключается в новом знании о морфологии, цитогенетике и нуклеотидных последовательностях генов *COI* и *ITS2* бабочек-голубянок комплекса *Polyommatus admetus*. Результаты, полученные в ходе работы, вносят вклад в изучение систематики, филогении и зоогеографии этой группы насекомых. Полученные данные помещены в международный банк данных и значительно дополняют полученные ранее. Эти данные могут быть использованы для реконструкции филогении и разработки системы семейства *Lycaenidae*.

По результатам исследования были сделаны доклады на восьми конференциях, шесть из которых являются международными. Участие в конференциях с результатами



диссертационной работы подтверждают, что основные результаты исследований Вишневецкой М.С. были в полной мере апробированы.

Методическое обеспечение проведённого исследования достаточно для достоверности полученных результатов. Все представленные положения автором в полной мере доказаны в тексте самой диссертации и закреплены в соответствующих выводах.

В целом, диссертационную работу М.С. Вишневецкой следует охарактеризовать положительно, а соискателя – как состоявшегося, вдумчивого, внимательного и эрудированного энтомолога-исследователя.

Каждый вывод диссертации соответствует экспериментальным данным.

Структура автореферата полно отражает содержание диссертации.

Тем не менее, диссертация не лишена отдельных недочётов, например:

1. Фраза (стр. 6), что подрод *Agrodiatus* "распространился в Западной Палеарктике" сформулирована неверно. Напротив, ряд видов этого подрода (*A. damon*, *A. damone* и даже один вид из группы/линии *admetus* – *A. rippartii*, обитают не только в Западной, но и в Центральной Палеарктике, вплоть до озера Байкал. Но максимум их видового разнообразия приходится именно на Западную Палеарктику, особенно если говорить только об исследуемой группе видов. Кроме того, роды и семейства вообще никуда не распространяются и нигде не обитают, так как это абстрактные понятия, а распространяются особи, виды. Можно говорить, что ареал рода расширился до каких-то пределов.

2. Неудачно сформулированы положения, выносимые на защиту (стр. 11):

А) нужно было обязательно упомянуть, что это положение, что «морфологические признаки не могут быть использованы для диагностики таксонов» касается или только подрода *Agrodiaetus*, или только конкретной видовой группы/линии *admetus* в данном роде.

Б) к этому положению следовало бы добавить также, что одна голоцентрическая (как в случае изученной группы дневных бабочек) хромосома может конъюгировать не только с одной, но также с парой хромосом.

3. Нет чёткого определения термина "мономорфный комплекс", который используется по всему тексту диссертации. Нужно было вначале дать определение, что «под термином "мономорфный комплекс" далее понимается виды, принадлежащие к линии *admetus* и двумкладам – *admetus* и *dolus*». Дело в том, что мономорфные комплексы видов есть в разных группах бабочек. И почему комплекс называется мономорфным, если в него входит *A. dolus* - вид с голубым, а не коричневым верхом самцов? Корректнее этот комплекс было бы называть "линией *admetus*" или "группой *admetus*".

3. При типизации крылового рисунка группы/линии *admetus* (стр. 47-52) нет пояснения, почему один и тот же вид (например, *timfristos* для 4-го и 5-го типов и ряд других таксонов) упомянут в разных типах рисунка крыльев. Если это говорит о значительной изменчивости рисунка, это нужно было бы отметить специально, а не умолчать. Почему тип 5 характерен для *A. rippartii* только из Западной Европы, а не из всех частей его ареала? По крайней мере, особи из Западной Сибири вполне сходны с 5-м типом.



4. Защищаемые положения и выводы идентичны (1, 2, 4/5, 5/6), но их идентичность не желательна. Обычно выводы представляют собой конкретные результаты исследования, а защищаемые положения – вытекающие из выводов следствия, которые ранее не были известны.

5. Некорректно трактуется дискальный ряд чёрных точек как субмаргинальный (правильность трактовки см., например, Higgins, L. 1970-1977. Butterflies of Britain and Europe). Субмаргинальный рисунок назван соискателем как маргинальный, хотя он расположен близ края крыла, а не по самому краю.

6. Стр. 15: «Однако комплекс мономорфных таксонов представлен всё теми же двумя таксонами, хотя их ранг повышен до видового: *P. admetus* и *P. ripertii* (синоним *P. ripartii*).» Но *ripertii* – не синоним (у синонимичного названия должен существовать тип), а неверное написание вида *A. ripartii*.

7. Стр. 16: «*P. mithridates*, ранее отмеченный де Лессом, как стоящий особняком (de Lesse, 1960a), имеет голубые чешуйки на крыльях» – из фразы совершенно непонятно, речь идёт об отдельных голубых чешуйках, или о полностью голубом верхе самцов? На самом деле речь идёт только об отдельных голубых чешуйках, но из текста это не очевидно. Отдельные голубые чешуйки бывают и у видов из "мономорфного комплекса".

8. В диссертации опущен стандартный обзор таксонов "мономорфного комплекса" коричневых *Agrodiaetus* с данными по их ареалам, что затрудняет восприятие материалов диссертации.

9. стр. 46-47: очень неудачно подобрана фотография, показывающая наличие белого штриха между дискальным пятном и постдискальным рядом пятнышек снизу п.крл. у *orphicus orphicus* – его не видно совсем. На аналогичном фото в автореферате он еле виден, но виден.

10. Нет пояснения необщепринятого термина voucher (ваучер), который используется, например, на рис. 18 (стр. 73) для *A. damon* из департамента Приморских Альп. Почему нельзя использовать широкоупотребляемое слово "образец"? Используемое в диссертации значение слова "voucher" отсутствует, например, в Вебстеровском толковом словаре английского языка за 1992 год. Из этого следует, что слово нельзя считать общеупотребительным и такие значения следует избегать.

11. стр.95-96: Много раз говорится, что *A. ripartii* представлен 3 кластерами, причём один – Испания-Франция-Италия, другой (евразиатский) от Испании до Монголии. Однако нигде нет указаний, по каким провинциям Испании разделены эти два кластера. Также явно не отмечено, встречаются ли в Испании представители этих двух кластеров именно симпатрично, в том числе в пределах одной и той же популяции?

12. Вывод о репродуктивной изоляции *P. rjabovianus* и *P. pseudorjabovi* слабо обоснован, так как принадлежность к разнымкладам на филогенетических реконструкциях ничего не может сказать о жизнеспособности потомков, что обычно учитывается сторонниками биологической концепции вида.

**Заключение.** Диссертация Вишневской Марии Сергеевны «Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lysaenidae) на основе анализа молекулярных маркёров», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, выполненную на высоком профессиональном уровне и отвечает паспорту специальности 03.02.05 – энтомология.

Она хорошо оформлена, иллюстрирована достаточным объёмом рисунков и таблиц и оставляет хорошее впечатление.

Автореферат и 12 публикаций (из них 3 в изданиях, рекомендованных ВАК) полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа соответствует требованиям положения «О порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Вишневская Мария Сергеевна, достойна присуждения искомой степени по специальности 03.02.05 – энтомология.

Отзыв составлен докторами биологических наук, ведущими научными сотрудниками лаборатории филогении и фауногенеза ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» Сибирского отделения Российской академии наук Бугровым Александром Геннадьевичем и Дубатовым Владимиром Викторовичем. Отзыв рассмотрен и обсуждён на заседании лаборатории филогении и фауногенеза ФГБУН «ИСиЭЖ» СО РАН 24.08.2018 г. Присутствовало на заседании 9 человек. Результаты голосования: «за» – 9 человек, «против» – нет (протокол заседания № 4 от 24.08.2018 г.).

Заведующий лабораторией филогении и фауногенеза  
ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН  
доктор биологических наук  
Александр Александрович Легалов



Адрес организации:  
630091, г. Новосибирск, 91, ул. Фрунзе, 11  
Телефон-факс: +7 (383) 217-09-73  
Электронные адреса и телефоны составителей отзыва:  
Дубатов В.В.: vvdubat@mail.ru; +7-906-994-03-72  
Бугров А.Г.: bugrov@fen.nsu.ru; +7-913-487-61-46