

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Федоровой Людмилы Ивановны

**«БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ГИРУДОФАУНЫ БАССЕЙНА РЕКИ ИРТЫШ (КАЗАХСТАН)»**,

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология

Работа посвящена вопросам изучения биоразнообразия, морфологической и генетической идентификации, анализа внутривидового полиморфизма по молекулярным маркерам и филогеографии представителей интересной в экологическом и эволюционном аспекте группы пресноводных беспозвоночных – пиявок (*Hirudinea*). Актуальность темы несомненна в фундаментальном плане, поскольку комплексное использование традиционных морфоэкологических и современных молекулярных методов позволяет проводить инвентаризацию биоразнообразия, исследовать микроэволюционные процессы, формирующие генофонд важных в экологическом аспекте видов беспозвоночных, к которым несомненно относятся пиявки. Представители гирудофауны не только важны как элемент трофических сетей, они широко используются как биоиндикаторы, а некоторые виды важны и для медицины. Критическое состояние ряда видов пиявок в исследуемом регионе Восточного Казахстана, вызванное антропогенными изменениями состояния среды, необходимость научного обоснования сохранения этих популяций, делает работу актуальной и в практическом аспекте. Новизна исследования связана с крайне слабой изученностью пиявок в регионе, в использовании в работе репрезентативного материала по целому комплексу видов гирудинид, отработкой методов ДНК-идентификации, оригинальными и приоритетными данными являются и предложенные филогенетические и филогеографические реконструкции.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Текст предваряет список сокращений, основной текст состоит из Введения, глав 1 - Физико-географическая характеристика бассейна реки Иртыш, 2 – Литературный обзор, 3 - Материалы и методы исследования, глав 4, 5 с результатами собственных исследований и их обсуждением, а также Выводов и

списка использованной литературы. Общее число страниц диссертации 170, из которых 133 составляет основной текст, остальное – список использованной литературы из 196 источников (из них 131 на иностранных языках), и Приложений, в которые вынесены некоторые таблицы с описанием материала и матрицами генетических дистанций. Работа содержит 32 рисунка, 30 таблиц основного текста и 6 таблиц, вынесенных в Приложение.

Во Введении автор подчеркивает актуальность исследования, которая не вызывает сомнений, описывает степень изученности проблемы, формулирует и обосновывает поставленные цель и задачи, научную новизну работы, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту, декларирует свое личное участие. Представлены также публикации и апробация результатов на научных конференциях, конгрессах и совещаниях. Описаны объём и структура диссертации.

В Главе 1 дана физико-географическая характеристика бассейна реки Иртыш. Разделы 1.1 Географическое положение и рельеф, 1.2 Климатические условия и 1.3. написаны очень тщательно и подробно, с уровнем детализации, необходимым для восприятия последующего изложения особенностей биологии и экологии пиявок. В разделе 1.4 приведены имеющиеся сведения об антропогенной трансформации речных экосистем. Выделяется пять эколого-гидрохимических районов бассейна р. Иртыш по степени загрязнения поверхностных вод на основании гидрохимического индекса загрязнения воды (ИЗВ). Автор делает вывод о том, что в бассейне р. Иртыш в настоящее время, наблюдается напряженная водохозяйственная и экологическая обстановка, возникшая вследствие нерационального использования в неудовлетворительной охраны водных ресурсов.

Глава 2 посвящена анализу литературных данных по объектам исследования. В обзоре литературы тщательно подобраны и квалифицированно проанализированы сведения из литературных источников об экологических и биологических особенностях пиявок и применявшихся ранее для их изучения методах. В разделе 2.1 автор даёт характеристику гирудиней с изложением современных взглядов на их филогению и проблемы идентификации видов, анализа биоразнообразия и таксономии группы. Одной из таких проблем автор

справедливо считает использование для анализа музейных образцов и связанные с этим методологические сложности. Другой важной проблемой является наличие криптических видов с крайне слабой морфологической дифференциацией. Уделяется внимание имеющимся сведениям об анатомо-физиологических характеристиках пиявок, их репродуктивным особенностям. В подразделе 2.3.1 даются сведения о зоогеографических закономерностях распространения пиявок. Раздел 2.1.5 является хорошим примером аналитического обзора трофических связей пиявок и их многообразия. Далее описаны подходы к анализу биоразнообразия и роль генетических методов в получении его объективных количественных оценок. Особое внимание автор уделяет методам разграничения таксонов. В целом обзор весьма информативен, построен логично, содержит необходимые элементы анализа.

Глава 3 посвящена описанию использованного Материала и применённых Методов исследований. Выборки пиявок собраны автором в ходе полевых работ на территории Казахстана и репрезентативны для решения поставленных задач. Материал представляет 24 локальности в бассейне Иртыша на территории Казахстана. Необходимо крайне позитивно отметить проведённую автором цифровую фотодокументацию собранного материала. Автор не приводит в этом разделе численности исследованных выборок, однако из следующего раздела выясняется, что всего было фотодокументировано 618 экземпляров пиявок. Далее в разделе 3.3 автор описывает взятие гидрохимических показателей. Раздел 3.4 посвящён описанию методов статистического анализа экологических данных. В разделе 3.5 автор приводит описание молекулярно-генетических методов, включая выделение ДНК (в ходе работ были модифицированы стандартные методы), ПЦР, электрофоретического анализа и визуализации продуктов ПЦР и секвенирования последовательности гена COI (ДНК-штрихкодирование). Был применен также биоинформационный анализ с целью сравнения степени дивергенции последовательностей таргетного гена с последовательностями из GenBank. Выбор молекулярного маркера – наследуемого по материнской линии фрагмента мтДНК хорошо обоснован. Этот маркер широко применяется для подобных целей в мире, в том числе и на исследуемой группе. В целом полевые, камеральные, лабораторные и

статистические методы адекватны задачам и описаны с достаточной для воспроизведения подробностью.

В Главе 4 изложены результаты собственных исследований гирудофауны бассейна Иртыша и их обсуждение. В разделе 4.1 приведены данные морфологического анализа всех идентифицированных видов с описанием характеристических признаков и распространения видов в исследуемом регионе. Описания снабжены фотографиями представителей видов и картами-схемами их распространения. Ряд видов обнаружен на территории Казахстана впервые. В целом проведённая масштабная работа по инвентаризации биологического разнообразия пиявок отличается тщательностью, уникальна для региона и может служить примером для подобных региональных зоогеографических исследований.

Раздел 4.2 посвящён результатам филогенетического анализа с помощью маркера *COI* бесхоботных пиявок. Интересный результат, соответствующий вновь обнаруженному криптическому комплексу – отделение восточно-казахстанских представителей *Erpobdella monostriata* от европейских. В пределах того же рода для четырёх видов получены высокие оценки уровней генетической вариабельности (d). Всего в роде выявлено 9 криптических комплексов, и автор делает справедливый вывод о необходимости ревизии морфологических данных. Более того, результаты диссертационной работы создают основу для создания определительных ключей «нового поколения» для пиявок, в которых в качестве диагностических признаков могут быть использованы именно те, которые не противоречат очевидным наблюдаемым паттернам дифференциации по молекулярным маркерам.

Для отряда Hirudiniformes кластеризация таксонов на уровне семейств в целом согласуется с существующей классификацией. Тем не менее, молекулярно-генетические данные позволили сделать ряд уточнений в видовых диагнозах.

Для хоботных пиявок процент информативных сайтов был существенно ниже, однако в целом древо имело устойчивую топологию с высоким уровнем статистической поддержки узлов.

В целом результаты применения молекулярно-генетического подхода оказались весьма впечатляющими. Данные по изменчивости митохондриального гена *COI* позволили не только оценить видовое разнообразие пиявок бассейна Иртыша, но и поставить вопрос об открытии новых для науки семи криптических видов (*Alboglossiphonia* sp., три *Glossiphonia* sp. и три *Erpobdella* sp.), хотя подтверждение этого факта требует дальнейших исследований.

Глава 5 посвящена пространственному распределению пиявок и влиянию различных экологических факторов на жизнедеятельность пиявок. Проанализирована приуроченность видов пиявок к типам водной среды, характерные особенности описаны как для паразитических, так и для непаразитических (макрофаговых) видов. Интересно, что и для впервые выявленных криптических видов получены различия в индексах доминирования (таб. 15) для различных условий обитания. Показана неоднородность пространственного распределения видового разнообразия и структурных компонентов популяции гирудинид, причём изменения данных показателей носят закономерный характер и зависят от среды обитания.

Раздел 5.2 посвящён влиянию факторов окружающей среды на гирудофауну. Достоверные корреляции обнаружены не только с типом водной среды, но и с уровнем загрязнения местообитаний. Заслуживает высокой оценки применение многомерных статистических методов (многомерное шкалирование и др.). Корреляционный анализ показал наличие тесных связей внутри пространства показателей биоразнообразия и показателей биоразнообразия с абиотическими факторами. Выпадение наиболее чувствительных видов при повышении уровня загрязнений является хоть и ожидаемым феноменом, но в работе оно показано впервые для региона и с использованием весьма убедительного доказательного аппарата.

Несмотря на общий высокий научный уровень работы, можно сделать некоторые замечания.

С одной стороны, применение молекулярного маркера – митохондриального гена *COI* и всей не только технологии, но и идеологии метода ДНК-штрихкодирования, позволило достичь существенного прогресса в

понимании структуры видового и внутривидового (в узком смысле «генетического») разнообразия пиявок. С другой стороны, этот метод имеет ряд ограничений. Проблема биологического вида несколько шире проблемы описания диапазона значений уровней дивергенции по одному митохондриальному гену с сравнением этих значений с реперными показателями, принимаемыми как пороговые. Не отрицая последовательного следования методологии ДНК-штрихкодирования, всё же следует признать эти данные лишь первым шагом к описанию генетического разнообразия на новом методическом уровне. В настоящее время рекомендуется применять не один, а несколько классов маркеров, и даже в проектах, которые заявляют себя как находящиеся в рамках «ДНК-баркодинга» как правило, помимо одного и более митохондриальных маркеров используется и ряд ядерных генов, которые отражают не только наследование нерекombинирующей органелльной ДНК по материнской линии, но и бипарентальное (двуродительское) наследование и рекомбинацию, то есть процессы, затрагивающие основную, хромосомную часть генома эукариот. Это позволяет отслеживать эволюционные события, не связанные с чисто дивергентными микроэволюционными сценариями (которые могут быть представлены в виде простого «древа»), а, например, с гибридизацией, интродукцией и сетчатой эволюцией.

Выбор метода построения деревьев («Параметры всех молекулярно-филогенетических реконструкций основывался на статистическом методе максимального правдоподобия. Оптимальная модель эволюции для каждого набора данных определялась с помощью программы jModelTest v. 0.1 (Табл. 4) [155]. Выбор модели производился на основе значения байесовского информационного критерия (BIC)» - с. 66) не обсуждается в работе (почему не maximum parsimony и не байесовские, а ML – деревья, если это ML, что неочевидно).

Замечания по стилю. В ряде случаев не вполне удачны в тексте сочетания глаголов и существительных, например, обычно филогенетическое дерево «строят», а у автора оно «выведено» (с. 99, 102). Матрицы же обычно просто «получают», а у автора «строят».

Число опечаток в тексте невелико (напр., в подписи к рис. 24 – «молекулярн»).

Орфография и пунктуация: В работе есть примеры неправильного употребления форм глагола (вместо третьего лица настоящего времени – неопределённая форма, «получиться» вместо «получится» и т.д.). Не всегда верно расставлены и знаки препинания (напр., причастный оборот в начале последнего абзаца на с. 98 – лишняя запятая после «писциколиды», а в начале второго абзаца на той же странице, наоборот, не хватает запятой после «в таблице 8»).

Высказанные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работы.

Работа хорошо структурирована, изложена лаконично, что позволило описать объёмный фактический материал и тщательно обсудить полученные данные. Научный и лингвистический стиль текста диссертации, несмотря на отдельные недочёты, заслуживает в целом высокой оценки. Оформлена работа тщательно, рисунки и таблицы наглядные и информативные.

Рассматриваемая диссертационная работа, в которой проведён анализ генетической дифференциации и филогеографии пиявок бассейна Иртыша, представляет собой существенный вклад в **решение ряда фундаментальных проблем** эволюционной экологии, гидробиологии и филогенетики. При этом **практическая значимость** работы также несомненна. Материалы диссертации могут быть использованы при инвентаризации биоразнообразия, организации охраны популяций гидробионтов, особенно с учётом того, что пиявки являются важнейшими биоиндикаторами состояния среды. Результаты работы, несомненно, найдут применение при подготовке и повышении квалификации студентов, аспирантов и специалистов в области биологии и экологии в системе Минобрнауки.

В целом можно отметить, что автором проделан большой объём исследовательской работы, выборки и их репрезентативность достаточны для достижения заявленной цели. Применяемые методы выбраны обоснованно, все выводы основаны на анализе данных и их обсуждении, что не позволяет сомневаться в достоверности полученных автором результатов. Содержание

работы достаточно полно отражено в опубликованных статьях и автореферате. По теме диссертации автором опубликовано 12 печатных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе пять работ в рецензируемых журналах из списка ВАК, включая три статьи в зарубежных журналах, реферируемых Web of Science. Результаты представлены и апробированы на авторитетных научных конференциях и симпозиумах, в том числе международных.

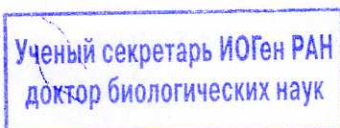
Таким образом, представленная Людмилой Ивановной Федоровой диссертационная работа является завершённым фундаментальным оригинальным научным исследованием, **отвечает** всем требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а также изложенным в пп. 9-14 утвержденного Правительством РФ Постановления №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней» критериям, а ее автор Федорова Л.И. **заслуживает** присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – экология.

Зав. отделом популяционной генетики,
зав. лабораторией популяционной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
доктор биологических наук,
119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, 3, тел. +7(499)135-5067, +7(499)135-6213
Email: dmitri_p@inbox.ru, dmitri.p17@gmail.com, Вебсайт <http://www.vigg.ru/>

03 декабря 2018 г.

Политов Дмитрий Владиславович

Подпись Д.В. Политова заверяю:



Огаркова О.А.