

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора кафедры зоологии и экологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский педагогический государственный университет», Кузнецовой Наталии Александровны на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук Шеховцова Сергея Викторовича «Генетическая изменчивость дождевых червей России и ее отражение в морфологии, филогении и филогеографии» по специальностям 1.5.12. Зоология и 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Актуальность диссертационного исследования С. В. Шеховцова обусловлена давно назревшей в почвенной зоологии проблемой верификации существующих видов. Это особенно важно для дождевых червей с их весьма ограниченным набором морфологических диагностических признаков. Соискателю удалось охватить генетическими исследованиями представителей различных таксономических и экологических групп дождевых червей. В итоге получена достаточно полная картина изменчивости группы по важнейшему критерию вида — молекулярно-генетическому.

Научная новизна работы связана не только с тем, что генетические исследования дождевых червей проведены впервые для огромной территории России. Принципиальным является то, что соискатель не ограничился традиционным ДНК-баркодингом, а шагнул намного дальше, применив методы следующего поколения, включая RADSeq, изучение транскриптомов и другие. Совокупность этих методов в рамках одного исследования открывает много нового и выводит его на передний край мировой науки.

Диссертационная работа заявлена по двум специальностям: 1.5.12. Зоология и 1.5.7. Генетика, что, несомненно, точно отражает характер исследования: зоологические и генетические данные в нем хорошо сбалансированы.

Обзор литературы (глава 1) обстоятелен и хорошо структурирован. Его первая часть, посвященная генетическим методам изучения дождевых червей, заслуживает отдельной публикации, которая была бы интересна многим специалистам. Далее представлена достаточно подробная характеристика девяти модельных видов. Этим сведениям, однако, не хватает карт ареалов, которые, представлены только для подвидов *Eisenia nordenskioldi*. Характеристики изученных видов приведены в удачной сводной таблице 1.5.10.1, обсуждение которой было бы весьма информативным в плане демонстрации различий модельных видов по ареалам, оседлости, способу размножения, пloidности и числа подвидов. Распространение дождевых червей тесно связано с их холодостойкостью, ведь районы вечной мерзлоты занимают более половины территории страны. Холодостойкость рассмотрена с точки зрения экофизиологических и биохимических данных. Обзор

исследований этого фактора представляется обоснованным в качестве экологического критерия вида, дополняющего генетический и морфологический критерии.

Методы исследования описаны самым подробным образом в главе 2. Единственное, чем хотелось бы дополнить данную главу – это количественные данные, характеризующие весь материал: число проанализированных особей разных видов дождевых червей различными методами. Отчасти эта информация встречается далее по тексту в различных таблицах, но отсутствует в сводном виде. Материал производит впечатление обширного, и на мой взгляд, важный положительный момент работы – широкое привлечение к его сбору волонтеров, усилиями которых собрано 2/3 объектов. Это современный способ, экономящий время и затраты, к тому же он способствует привлечению в науку молодежи.

Центральное место в исследовании занимает всестороннее изучение комплекса *Eisenia nordenskioldi* (глава 3). Различными генетическими методами соискателю удалось обнаружить более 9 филогенетических линий в пределах подвида *Eisenia n. nordenskioldi* и 6 — у *Eisenia n. pallida*. Более того, оба подвида оказались полифилетичными, что позволяет отказаться от этих традиционно используемых таксономических единиц. Дистанции между линиями указывают на их вероятный видовой статус, кроме того, они имеют вполне четкие ареалы. Исследуя далее феномен линий, автор обнаруживает, что некоторые из них (2 и 7) объединяют особей с различным числом хромосом. Ни один отдельно взятый морфологический признак, используемый в систематике дождевых червей, не позволяет определить линию, но их можно различить по комбинации этих признаков. Таким образом, линии не являются криптическими таксонами. Эти обнадеживающие данные желательно было бы также попытаться представить в виде таксономического ключа линий.

Автором была проверена способность линий к гибридизации в местах их симпатрии (линии 1 и 3). С помощью метода RADSeq гибриды были обнаружены, однако отсутствие примеси чужих аллелей у остальных особей предполагает вероятную стерильность гибридов 1 поколения. Изучена организация митохондриальных геномов 8 линий комплекса *Eisenia nordenskioldi*. Очень интересны данные по холодостойкости различных линий, поскольку лишь немногие из них распространены в высоких широтах. Экспериментально показана значительно большая холодостойкость таких линий, по сравнению с другими. Тем не менее оказалось, что холодостойкость не всегда объясняет ареалы линий: они могут отсутствовать там, где этот фактор их не лимитирует и, наоборот, присутствовать в суровых условиях, несмотря на низкую холодостойкость, находя подходящие условия зимовки. Эти данные тесно переплетаются с материалом, изложенным в главе 6, посвященной холодостойкости дождевых червей. В Представлен содержательный филогеографический анализ, показавший в числе прочего, что разнообразие линий комплекса *Eisenia nordenskioldi* в Восточной Сибири и Дальнего Востока — результат сохранения дождевых червей в рефугиумах во время циклов плейстоценовых оледенений.

Одним из основных итогов этого раздела исследований стало обоснование выделения как минимум двух видов из комплекса *Eisenia nordenskioldi*: *Eisenia nordenskioldi* s. str. и *Eisenia* sp. 1. Выделенные виды не соотносятся с традиционными подвидами, оказавшимися полифилетичными. Новое разделение убедительно обосновано, в том числе данными анализа митохондриального и ядерного геномов. В тоже время хочется заметить, что большие генетические различия между линиями внутри этих новых видов, подкрепленные морфологическими признаками, экологическим критерием (холодостойкость) и даже биологическим (гибриды, если и есть, то стерильны) — все это позволяет признать видовой статус не только групп линий, но самих выделенных линий или, по крайней мере, назвать их подвидами. Автор и сам признает видовой статус линий, однако не предлагает его использовать из вполне понятных практических соображений. Возможно, разработка определителя линий по комплексу морфологических признаков облегчила бы признание видами столь генетически далеких линий.

Данные по другим модельным видам дождевых червей представлены в главе 4 (Эндемики различных регионов России). Как и в случае *Eisenia nordenskioldi* высокая генетическая вариабельность показана различными методами для эндемичных видов дождевых червей: кавказского *Dendrobaena schmidtii* (потенциально выделяются 2 и даже более видов), дальневосточного *Drawida ghilarovi* (вероятны 3 вида). Часть этих видов морфологически не различимые двойники.

Отметим успех соискателя в решении интересного вопроса статуса цветковых морф *Drawida ghilarovi*, существенно различающихся по своим экологическим характеристикам, как установил ранее Г. Н. Ганин. Оказалось, что ни одна из трех морф не образовала отдельную филогенетическую ветвь, то есть это не экотипы. Более того, были изучены различия транскриптов, участвующих в синтезе порфиринов различных цветковых морф. Показано, что у всех морф в биосинтезе порфиринов задействован один и тот же набор генов, вероятно, отвечающих не только за окраску, а пигментация серой морфы связана с иными пигментами. Природа связи пигментации с экологическими характеристиками остается пока неизвестной, несмотря на заметное продвижение в решении этого вопроса. Генетическое разнообразие линий *Drawida ghilarovi* к северу резко сокращается, подтверждая гипотезу о недавнем заселении Дальнего Востока этим представителем тропического семейства Moniligastridae.

В заключении к главе соискатель сравнивает генетическую изменчивость дождевых червей и других почвенных беспозвоночных. Один из выводов, что дождевые черви относятся к тем группам, у которых филогенетические линии обитают симпатрично, что характерно для оседлых видов. На наш взгляд это аргумент в пользу видовой статус таких линий, по крайней мере, часть из которых, вероятно, возникла в ходе экологического видообразования.

Глава 5 посвящена перигринным видам. Отметим впечатляющий объем материала, использованного для реконструкции филогеографии *Aporrectodea caliginosa*: 550 образцов из 49 популяций. На территории России обнаружено 2 линии из трех, более обычна линия 2, а более редкая линия 3 имеет дизъюнктивный ареал. С учетом данных Генбанка показано, что расселение вида по Палеарктике шло из рефугиума на юге Западной Европы. Морфологические исследования всех трех линий показали значимые различия между ними, хотя ни один отдельно взятый признак, как и в случае *Eisenia nordenskioldi*, не мог быть использован для четкого различения линий. *Aporrectodea caliginosa* — вид, часто используемый в экологических и, особенно, экотоксикологических, исследованиях. Генетическая верификация линий в этом случае важна, поскольку генетические дистанции между линиями соответствуют видовым и между ними возможны и экофизиологические различия.

Еще один перигринный вид — *Aporrectodea rosea*, для которого было известно 2 линии: евросибирская и средиземноморская. Соискатель обнаружил более высокую гетерогенность евросибирской группы, выделив в ней две новые линии, а также базальную ветвь из нескольких линий в материалах из Беларуси. Эта находка предполагает не столько разделение вида на 2 линии в средиземноморском регионе, как считалось ранее, сколько возникновение евросибирской линии на территории Восточной Европы и последующее расселение ее на запад и восток. Интересно сравнение филогеографии двух видов *Aporrectodea: caliginosa* и *rosea*, показавшее существенные различия между ними.

Для *Octolasion tyrtaeum* была обнаружена новая, третья, линия и показано, что генетическая линия не всегда соотносится с морфологическим признаком — размером. Более того, оказалось, что другой близкий вид *O. cyaneum* объединяется с одной из линий *O. tyrtaeum*. Таким образом, обоснована необходимость пересмотра систематики этого комплекса видов, представленного не только различными линиями, но и расами с различной ploidy и предположительно разными способами размножения.

Необычными на фоне результатов по другим видам выглядят данные по *Dendrobaena octaedra*, у которого, несмотря на широкий ареал, обнаружена очень слабая генетическая изменчивость. Ее причины автор видит в недавнем, послеледниковом, расселении вида по Голарктике. *Lumbricus rubellus*, напротив, обладает высокой генетической изменчивостью, однако лишь одна из линий широко расселилась по Северной Евразии, что соискатель объясняет как эффектом основателя, так и какими-то биологическими особенностями, облегчающими расселение. Последнее предположение выглядит для меня более вероятным. Исключительный случай с точки зрения генетической изменчивости представляет собой *Dendrodrilus rubidus*. Для этого вида не обнаружено генетических линий, несмотря на наличие традиционно выделяемых подвидов и широкий ареал.

Особый интерес вызывает раздел 5.7 «Сравнение перекрестных видов», а именно «Паттерны генетической изменчивости перекрестных видов». Представлены весьма информативные обобщающие таблицы с числом линий каждого вида, а также показателями нуклеотидного и гаплотипического разнообразия в крупных регионах Евразии. Автор анализирует эти данные скорее в филогеографическом ключе. Однако можно было бы, и правда, попытаться выделить паттерны генетической структуры видов, столь различные у описанных выше объектов.

Последняя глава 6 посвящена молекулярным основам холодоустойчивости дождевых червей. На первый взгляд она выбивается из генетической направленности исследования. Однако по большому счету диссертационная работа нацелена на разработку представлений о виде у дождевых червей с привлечением большого объема новых молекулярных данных, даже если автор так это и не формулирует. В этом аспекте интерес представляют и метаболомные данные. Соискателю удалось выявить различия в холодоустойчивости генетических линий внутри нескольких подопытных видов и связать эти различия с концентрацией конкретных молекул. Метаболомный профиль таким образом оказывается еще одной характеристикой генетических линий, то есть вероятных видов дождевых червей.

В целом, считаю, что исследование С. В. Шеховцовым феномена филогенетических линий у дождевых червей служит превосходной основой для существенного продвижения на пути решения проблемы вида в этом таксоне. Работа уникальна по набору использованных генетических методов в рамках одного исследования. С их помощью открыто большое число новых генетических линий, по сути, видов. Эти данные соотнесены с морфологической изменчивостью. Реконструированы филогения и филогеография модельных видов. Выявлены возможности гибридизации линий. Открыто удивительное разнообразие генетической структуры видов и популяций у дождевых червей. Работа, несомненно, представляет собой выдающееся исследование, к тому же это первая диссертация по генетике почвенных животных в нашей стране. Обилие изложенной в ней (и публикациях соискателя) новой информации требует осмысления многими специалистами, а не только исследователями дождевых червей.

Выводы и положения логично вытекают из полученных данных и полностью обоснованы результатами исследования. Положения, на мой взгляд, могли бы носить более общий характер, однако, по своей сути они корректны.

В работе процитирован большой объем литературы, 617 источников, и все ссылки приведены не формально, а точно соответствуют обсуждаемым вопросам.

Текст диссертации хорошо структурирован, высоко информативен, четко изложен. Опечаток в тексте мало, но они есть, в частности, в автореферате глава 4 названа главой 3. Иногда встречается ненужное выделение курсивом латинских сокращений *sp*, *aff*, *s. str.*

Автореферат полностью соответствует тексту диссертации. Отметим высокое качество публикаций соискателя, которые представлены в ведущих зарубежных и отечественных журналах общебиологического, зоологического и генетического профиля что соответствует работе, защищаемой по специальностям «Зоология» и «Генетика». Исследования соискателя были неоднократно поддержаны грантами научных фондов.

Диссертационная работа Шеховцова Сергея Викторовича «Генетическая изменчивость дождевых червей России и ее отражение в морфологии, филогении и филогеографии», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.12. Зоология и 1.5.7. Генетика (биологические науки), самостоятельно выполненное новаторское исследование, существенно продвинувшее понимание проблемы вида в почвенной зоологии на основе масштабных данных по генетической изменчивости дождевых червей. Диссертация соответствует всем требованиям ВАК, в частности, о полноте изложения основных результатов работы в публикациях (пункты 11 и 13), соблюдает требования пункта 14 Положения о присуждении ученых степеней (Постановление Правительства № 842 от 24.09.2013 г.).

Считаю, что диссертационная работа С. В. Шеховцова по своему содержанию, полноте решенных задач, достоверности и значимости полученных результатов, их теоретическому и прикладному значению соответствует пункту 9 Положения о присуждении ученых степеней, и представляет собой научно-квалификационную работу, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. С. В. Шеховцов заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.12. Зоология и 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент  
доктор биологических наук  
по специальности 1.5.15. Экология,  
профессор кафедры зоологии и экологии  
ФГБОУ ВО «Московский педагогический  
государственный университет»

Кузнецова Наталия  
Александровна

Москва, 119991, улица Малая Пироговская  
дом 1, строение 1  
электронная почта – [mpnk@yandex.ru](mailto:mpnk@yandex.ru)

25 сентября 2023