

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**Шеховцова Сергея Викторовича**

«Генетическая изменчивость дождевых червей России и ее отражение в морфологии, филогении и филогеографии»,

представленную на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.12 – зоология и 1.5.7 – генетика

Диссертационная работа С.В. Шеховцова посвящена анализу генетической изменчивости дождевых червей (сем. Lumbricidae и представители других родственных семейств) России, по данным полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК. Профиль этой диссертации соответствует специальностям «зоология» и «генетика», поскольку, хотя решаются в основном зоологические задачи, при этом широко используются не только современные генетические методы, но популяционно-генетические, филогенетические и филогеографические подходы. Актуальность темы несомненна в фундаментальном плане, поскольку исследование позволит расширить существующие представления об эволюционной истории, филогении и филогеографии дождевых червей – группы, крайне важной в экологическом отношении, при этом характеризующейся ограниченной применимостью морфологических критериев разграничения видов и слабой эффективности использования традиционных признаков фенотипа для реконструкции их эволюционных взаимоотношений. Ситуация осложняется не только малым числом диагностических морфологических признаков, но и их высокой модификационной изменчивостью. На территории России обитает 56 видов дождевых червей, некоторые из них распространены широко, другие эндемичны, в основном дождевые черви представлены осёдлыми формами, однако часть видов относится к перепутанным. Выбор *Eisenia nordenskioldi* в качестве основного модельного объекта хорошо обоснован его относительной изученностью различными методами. Научная новизна исследования заключается в широком охвате сборами образцов территории и

представленности среди объектов исследования видов дождевых червей разных таксономических и экологических групп, и использовании для анализа генетической структуры нескольких классов молекулярно-генетических маркеров, включая полные митогеномы. Методы анализа ДНК основаны на секвенировании, в том числе нового поколения. Использование в работе репрезентативного материала, сравнение полученных данных по разным классам маркеров в едином обсуждении и предложенные автором реконструкции эволюционных сценариев являются приоритетными.

Диссертационная работа построена по традиционному плану, состоит из Списка сокращений, Введения, глав 1 - Обзор литературы, 2 – Методы исследования, четырёх глав (3-6) с результатами собственных исследований по разным группам объектов и научным проблемам, включающих также частные обсуждения и заключения по этим данным, а также Выводов и Списка использованной литературы. Общее число страниц диссертации 360, из которых включает список литературы из 617 источников (из них 159 на русском языке, остальные на иностранных). Работа содержит 73 рисунка и 33 таблицы.

Во Введении автор подчеркивает актуальность исследования, которая не вызывает сомнений в контексте исследований генетического разнообразия дождевых червей и сложностей, связанных с традиционными морфологическими подходами. Далее автор оценивает степень разработанности темы диссертации, подчёркивая недостаток данных по территории России, для которой известны лишь отдельные относительно давние исследования. Далее автор достаточно чётко формулирует и обосновывает поставленные цель и задачи, описывает область исследований, научную новизну работы, её теоретическую и научно-практическую значимость, методологию и методы исследования. Приводятся основные положения, выносимые на защиту. Степень достоверности результатов, в частности, подтверждается солидным списком конференций и включая международные, где были представлены и апробированы результаты работы. Приводится статистика опубликованных работ по теме диссертации.

Описаны объём и структура диссертации. Автор декларирует степень своего личного участия в различных аспектах работы, которую следует оценить как высокую. Завершается Введение Благодарностями и ссылками на источники финансирования исследований.

Глава 1 – Обзор литературных источников – содержит шесть разделов, часть из которых имеют подразделы. В разделе 1.1 описана краткая история изучения история изучения биоразнообразия дождевых червей России. Раздел 1.2 посвящён характеристике фауны изучаемой группы в России. Раздел 1.3 посвящён морфологическим основам систематики дождевых червей. В разделе 1.4 приведены основы анализа генетической изменчивости у дождевых червей и её специфики, как в методическом плане, так и в популяционно-генетическом, и в филогеографическом. Подразделы раздела 1.5 посвящены описанию биологии, таксономии изученных видов и таксономических групп люмбрицид, к которым они принадлежат, среди которых есть контрастные по экологии, в частности по способности к расселению. Завершает этот подраздел секция 1.5.10, в которой даётся сведённая в таблицу сравнительная характеристика видов, выбранных в качестве объектов исследования. Завершает литературный обзор раздел 1.6, посвящённый специфической теме - исследованиям холодостойкости дождевых червей и её биохимическим основам.

В целом нужно отметить, что обзор литературы содержит практически все необходимые источники, проведён их аналитический обзор с акцентом на вопросы, которые важны именно для рассматриваемых в диссертации проблем, он хорошо структурирован, логично построен, информативен. Автору удалось успешно проанализировать достижения мировой науки в предметной области работы, обозначить пробелы, которые призвано заполнить данное исследование. В первую очередь это сопоставление наблюдаемого морфологического и основанного на нём таксономического разнообразия, с одной стороны, и генетического разнообразия, в другой. Автор аргументирует перспективы применения молекулярно-генетических и геномных подходов, главной

проблемой для разработки представляя феномен существования у дождевых червей филогенетических линий. Среди важных экологических параметров автор особенно выделяет биохимические адаптации к замораживанию, как признак, лежащий в основе холодостойкости и во многом определяющий ареалы видов и филогенетических линий. Следует особо отметить грамотный научный язык как этого раздела, так и работы в целом.

Глава 2 посвящена описанию Методов исследований. Методы выбраны оправданно, адекватны задачам и описаны с необходимой для воспроизведения подробностью. Помимо обычных для подобных работ методов секвенирования по Сэнгеру митохондриальных (*cox-1*) и ядерных (внутренний транскрибируемый спейсер рибосомной ДНК) локусов использованы современные технологии высокопроизводительного секвенирования нового поколения: полный анализ транскриптома и частичное секвенирование генома (RADSeq). Описано выделение ДНК (2.1 – 2 методики для геномной ДНК и одна для плазмид), выделение РНК (2.2) двумя методикам, ПЦР (2.3) в реакциях ручной сборки и коммерческими наборами. В подразделах описаны методики амплификации митохондриальных фрагментов *cox-1* у каждого вида, спейсеров рибосомной ДНК ITS2 и фрагмента гена гистона H3 у некоторых из них. Раздел 2.4 посвящён описанию секвенирования транскриптомов у *Eisenia nordenskioldi* (2.4.1) и *Drawida ghilarovi* (2.4.2). Далее (2.5) описывается применённый вариант метода RADSeq. Затем кратко, но с надлежащей степенью детализации описаны методы электрофореза нуклеиновых кислот (2.6), подготовки компетентных клеток (2.7) и трансформации (2.8) *E. coli*, поиск успешных трансформантов (2.9), элюции ДНК (2.10). Для оценки размера генома был адекватно выбран метод проточной цитометрии (2.11). Описаны также методы ЯМР для анализа метаболитов двух видов червей, устойчивых к замораживанию. Завершает главу подробное описание применённых биоинформационных технологий. В целом выбор и описание методик даётся в работе на высоком уровне. При этом описание материала, использованного для тех или иных видов работ на разных

видах вынесено в начало соответствующих разделов глав, описывающих результаты исследований.

Глава 3 посвящена исследованиям *Eisenia nordenskioldi* – вида с обширным ареалом, на котором специалистами отмечалась значительная морфологическая изменчивость. Традиционная точка зрения на существование симпатричных пигментированного и непигментированного подвида позволяло предполагать у этого вида и «высокую генетическую изменчивость» (см. в этом контексте ниже замечание). В данной диссертационной работе выявлено существование ряда достаточно сильно дивергировавших филогенетических линий, причём не только по мтДНК, но и по сиквенсам транскриптомов, отражающих белок-кодирующую часть ядерного генома. Специальный подраздел 3.4.3 посвящён сравнению филогенетических паттернов, полученных с помощью сэнгеровского секвенирования митохондриального фрагмента *cox-1*, а также транскриптомных данных. Интересно, что результаты, полученные при анализе транскриптомов на приборах IonTorrent и Illumina, оказались вполне сопоставимыми, несмотря на разные применяемые технологии. В то же время номинативные подвиды *E. nordenskioldi* не получили поддержки как монофилетические линии ни в одном из видов анализа. Весьма показательным, что представители филогенетических линий имеют существенные, хотя и не диагностические, различия в морфологии (3.6), что может являться, по мнению автора, индикатором и экологической специализации. Ядерные маркеры RADSeq с последующим анализом байесовской кластеризации в семействе программ Structure / CLUMPAK были применены на некоторых образцах с целью выявить различия между линиями по ядерному геному, и они воспроизвели ожидаемое из данных мтДНК разбиение на две группы. Помимо этого, выявленные в обеих исследованных локальностях единичные особи с равной долей исходных кластеров могут быть диагностированы как «межлинейные» гибриды, хотя сам автор относится к этим данным с осторожностью. Завершает главу очень интересное исследование молекулярных основ холодоустойчивости у эйзении. В целом глава всесторонне рассматривает популяционные, филогеографические и адаптационные аспекты

дифференциации у данного вида, в результате постулирует существование сложно организованного видового комплекса и вносит существенный вклад в познание путей эволюции таксона.

Глава 4 посвящена анализу генетической изменчивости видов-эндемиков различных регионов России. В частности, у эндемика Кавказа *Dendrobaena schmidtii* по данным мтДНК и ITS2 автором диссертации было выявлено существование двух клад с субкладами, которые могут свидетельствовать о наличии не менее двух криптических видов. На три вида по молекулярным данным предлагается разбить и дальневосточных дождевых червей комплекса *Drawida ghilarovi*. Примечательно, что в обоих случаях наблюдалась корреляция генетических профилей по молекулярным маркерам с окраской выделяемых форм. Глава весьма содержательна и содержит много новых приоритетных сведений о генетической дифференциации рассматриваемых видов дождевых червей.

В Главе 5 приводятся результаты исследования перелетных видов дождевых червей с помощью гена мтДНК *cox-1*, а для некоторых видов и ядерных генов гистона H3 и спейсера рибосомной ДНК ITS2. Наблюдаемые филогенетические паттерны ставятся в соответствие с морфологической и экологической вариабельностью, что следует признать плодотворным подходом, который позволил получить много новой информации о современном генетическом разнообразии изучаемых видов и истории его формирования в предыдущие геологические эпохи. Обобщение данных по разным видам позволило сделать ряд фундаментальных выводов, в частности, проливающих свет на историю и время их расселения, соотношение морфологических, экологических, хромосомных и молекулярно-генетических паттернов дифференциации.

Глава 6 посвящена анализу молекулярных основ холодоустойчивости дождевых червей. В качестве объектов выбран вид *D. octaedra* и одна из автохтонных сибирских форм эйзении Норденшельда - *Eisenia* sp. aff. *nordenskioldi* f. *pallida*. Анализ спектров метаболитов с помощью <sup>1</sup>H ЯМР

показал достоверные изменения концентрации 22 веществ при замораживании. В качестве единственного низкомолекулярного криопротектора у обоих видов была названа глюкоза, остальные соединения скорее маркируют процесс, являясь побочными метаболитами. Подчёркивается роль анаэробного гликолиза в формировании криопротекторных адаптаций. Для описанных «линий» эйзении предполагается формирование бореально-субарктического ареала в связи с общей холодоустойчивостью вида, тогда как особенности современного распространения отдельных линий обусловлены историей их расселения.

Экспериментальные главы представляют результаты исследований автора, содержат много оригинальной информации, полученной в ходе собственного исследования молекулярной изменчивости дождевых червей в связи с решением разнообразных поставленных задач, связанных общей целью. При этом факты сопоставляются как внутри собственных массивов данных, так и ставятся в контекст мировой системы знаний о генетическом полиморфизме, то есть необходимое глубокое обсуждение присутствует в текстах этих глав, как и частные заключения по каждому из исследованных вопросов.

Несмотря на общий высокий научный уровень работы, можно сделать некоторые замечания, не имеющие, впрочем, принципиального характера.

На мой взгляд, было бы удобнее для читателей диссертации, если бы автор всё же привёл сводную статистику объёма материала для тех или иных исследований конкретных видов, например, в начале главы 2, возможно, в виде таблицы.

По тексту диссертации автор часто пишет о высокой или низкой генетической изменчивости, не конкретизируя, о какой из её компонент идёт речь, а именно о внутри- или межпопуляционной. Ситуация, когда изменчивость «высокая», но целиком относится к внутривнутрипопуляционной ( $F_{ST}=0$ ), принципиально отличается от ситуации, когда изменчивости столь же высока, или не столь же высока, но распределена в основном между популяциями ( $0,5 < F_{ST} < 1,0$ ). В целом иерархический анализ популяционной генетической

подразделённости ( $F$ -статистики, AMOVA) мог бы, но не стал сильной стороной диссертации, что, как можно предполагать, связано с тем, что реальные популяционные выборки не всегда были доступны или не являлись целью при сборе материала для исследований.

Среди научных форумов, где представлялись и фактически апробировались результаты работы, нет ни одной международной конференции в узком смысле, то есть прошедшей за рубежом, это за 10+ лет, что довольно необычно для докторской диссертации.

В оформлении автореферата допущена ошибка в нумерации глав – глава 3 присутствует дважды (вместо 3 и 4).

На рис. 6. «основные горные системы» обозначены пунктирными линиями, однако сам выбор этих систем представляет загадку. Такое впечатление, что не только такие же «основные» для Сибири горы как Алтай и Саяны, остаются вне зоны внимания, и соответственно, не обозначены на карте-схеме, но и, например, Становой хребет, который мог бы иметь отношение к обсуждению дифференциации реально проанализированных якутских выборок.

При оформлении таблиц (напр., табл. 6.1), возможно, подробные списки обозначений и сокращений стоило бы вынести в примечания под телом таблицы, тогда как присутствие их в заголовках перегружает эти элементы оформления.

Имеются отдельные редкие опечатки, напр., с. 138 стр. 2 – «митохондриальных» и синтаксические несогласованности, не мешающие восприятию текста.

Следует отметить, что высказанные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работы.

Работа хорошо структурирована, что позволило подробно описать полученные результаты и тщательно обсудить их. Научный стиль текста диссертации заслуживает самой высокой оценки. Оформлена диссертация тщательно, рисунки и таблицы наглядны и информативны.



Рассматриваемая диссертационная работа представляет собой существенный вклад в решение ряда **фундаментальных** проблем зоологии, эволюционной биологии и популяционной генетики, в частности, проливают свет на наличие криптических видов и хорошо дифференцированных внутривидовых филогенетических линий у ещё одной экологически важной группы организмов, у которых данных по этому вопросу было критически мало, и где данная работы закрывает немало «белых пятен», в то же время приоткрывая горизонты для будущих перспективных исследований. При этом **практическая значимость** работы также несомненна - материалы диссертации могут быть использованы при инвентаризации биоразнообразия, в частности, составлении списков видов, организации изучения и охраны генофондов почвенных беспозвоночных на ООПТ, в дикой природе и в антропогенных ландшафтах. Результаты работы, несомненно, найдут применение при подготовке и повышении квалификации студентов, аспирантов и специалистов в области биологии в системе Минобрнауки.

В целом, нужно отметить, что автором проделан большой объем исследовательской работы, выборки и их репрезентативность достаточны для достижения заявленной цели. Применение использованных методов 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 опубликована 31 печатная работ в отечественных и зарубежных периодических изданиях из списка, рекомендованного ВАК, 2 статьи в прочих периодических изданиях. Опубликовано также 13 тезисов конференций по материалам диссертационной работы, которая таким образом, успешно прошла апробацию на авторитетных научных конференциях и школах, в том числе международных и с международным участием (все на территории РФ).

Таким образом, представленная Сергеем Викторовичем Шеховцовым диссертационная работа является завершённым фундаментальным оригинальным научным исследованием, отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК к докторским диссертациям, а также критериям, изложенным в пп. 9-11, 13-14 утвержденного Правительством РФ Постановления №842 от 24 сентября 2013 г. «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор Шеховцов С.В. заслуживает присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.12 – зоология и 1.5.7 - генетика.

Главный научный сотрудник, заведующий отделом популяционной генетики, заведующий 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/>

Политов Дмитрий Владиславович

06 октября 2023 г.

Подпись Д.В. Политова заверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,  
доктор биологических наук,

Горячева Ирина Игоревна

06 октября 2023/г: