

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу Болбат Александра Васильевича
на тему «**Структура и эволюция митохондриального генома реликтовых пиявок**»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7. – генетика

Актуальность

Диссертация Болбат А. В. посвящена изучению эволюции генома пиявок отряда *Acanthobdellida*. Данный отряд имеет значительный научный интерес ввиду его предполагаемого промежуточного эволюционного положения между малощетинковыми червями (*Oligochaeta*) и пиявками (*Hirudinea*). Как часто бывает в таксонах беспозвоночных, использование морфологических признаков видов *Acanthobdellida* недостаточно для создания полноценной картины эволюционных взаимоотношений внутри отряда. Сложности получения биологического материала ввиду труднодоступности мест обитания акантобделл, специфики их биологического цикла и экологических особенностей на данный момент позволили получить лишь единичные сведения о первичной структуре отдельных фрагментов их генома, на основе которых оценка филогенетического положения акантобделлид оказалась неоднозначной. На сегодняшний день полногеномных исследований акантобделлид не проводилось. В настоящее время остро ощущается недостаток информации о структуре генома *Acanthobdella peledina*, и полностью отсутствуют какие-либо генетические данные по виду *Paracanthobdella livanowi*, считающихся «живыми реликтами» и являющихся важными звеньями для понимания эволюции мировой фауны кольцецов. Таким образом, автором был использован метод полногеномного секвенирования для получения данных о полных нуклеотидных последовательностях митохондриального генома пиявок, которые могут быть использованы для установления филогенетических взаимоотношений видов отряда *Acanthobdellida*.

Научная новизна

Автором впервые получены полногеномные данные для восьми образцов акантобделлид из географически разрозненных водных бассейнов Евразии, от Швеции до Камчатки (*Acanthobdella peledina* и *Paracanthobdella livanowi*), а также четырех образцов эндемичных гирудинид оз. Байкал (*Baicaloclepsis echimulata*, *Baicaloclepsis grubei* и два образца *Codonobdella* sp.). В ходе работы были собраны и аннотированы митохондриальные

геномы восьми образцов из 7 видов аннелид (*Lumbriculus variegatus*, *Glossiphonia complanata*, *Glossiphonia concolor*, *Theromyzon tessulatum*, *Piscicola geometra*, *Erpobdella octoculata* и два образца *Haemopis sanguisuga*). Впервые полные митохондриальные геномы акантобделлид были использованы для реконструкции филогенетической истории кольчатых червей. Автором получены первые сведения о генетических дистанциях между представителями вида *A. peledina* из разных мест обитания, а также их дистанций до представителей вида *P. livanowi*. Результаты данной работы несомненно помогут уточнить положение акантобделлид в системе Clitellata, а также таксономический статус *A. peledina* и *P. livanowi*.

Структура диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру, с небольшими отклонениями: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, заключение, выводы и список литературы, который включает 200 источников. Результаты и обсуждение представлены в двух главах: «Структура митохондриального генома аннелид» и «Эволюция митохондриального генома акантобделлид». Работа изложена на 137 страницах, содержит 29 рисунков, 12 таблиц и 14 приложений.

Введение посвящено обоснованию актуальности проблемы, дана краткая характеристика общей эволюции митохондриальных геномов, а также подробно объяснена проблематика построения филогении отряда Acanthobdellida. В данном разделе поставлена цель и определены задачи работы. Приведены основные характеристики работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, методология и методы диссертационного исследования, основные положения выносимые на защиту, а также личный вклад автора.

В **Обзоре литературы** подробно дана характеристика отряда акантобделлид, их морфологические особенности, ареал обитания, хозяева и история изучения эволюции данных паразитов. Рассмотрена структура митохондриального генома животных в общем, и его применимость для филогенетических реконструкций. Дана характеристика методов секвенирования нового поколения. Подробнейшим образом описаны и обсуждены биоинформатические методы анализа последовательностей, а также некоторых программ, которые используются для построения филогений.

В разделе **Материалы и методы** подробно и исчерпывающе описаны методы сбора, выделения и секвенирования ДНК из образцов пиявок. Подробно описана методика сборки и аннотации геномов пиявок. Также подробно описаны программы и параметры филогенетического анализа и проверки достоверности деревьев. Выбор используемых методов исследования полностью соответствует поставленным в диссертации задачам.

Главы результатов и обсуждений как таковой не обозначено. Результаты и их обсуждение представлены в двух главах. В главе **Структура митохондриального генома аннелид** описаны характеристики полученных в данной работе митохондриальных геномов пиявок. Дана информация о количестве прочтений и подробности геномной сборки. Представлены данные о последовательности генов в митохондриальных геномах, которые оказались различными для разных семейств отряда *Acanthobdellida*. Наконец в данной главе представлены проаннотированные митохондриальные геномы *Acanthobdella peledina* и *Paracanthobdella livanowi*. Важным результатом является обнаружение уникального региона с многократными тандемными повторами фрагментов генов *atp6* и *trnR* у *A. peledina*. Данный регион имеет неконсервативную длину и структуру у образцов из разных географических районов Северной Евразии, что, скорее всего, свидетельствует о его нефункциональности. Подобный регион отсутствует у сестринского вида *P. livanowi*, что указывает на его формирование после дивергенции этих видов.

В главе **Эволюция митохондриального генома акантобделлид** представлены результаты филогенетического анализа видов отряда *Acanthobdella* на основе как отдельных фрагментов генов *COI* и *12S*, так и на основе сравнения полных митохондриальных геномов. Для каждого гена, и полногеномного набора, создано по два набора данных: сегментированный и несегментированный. Для каждого из данных шести наборов был проведен анализ двумя методами построения филогенетических деревьев: методом Байеса в программе BEAST и методом максимального правдоподобия с помощью программы IQ-Tree. Таким образом, в работе сконструировано 12 филогенетических деревьев. В данной главе проводится сравнение полученных филогений, анализируются длины и статистическая поддержка ветвей, и обсуждаются значения сегментации и использование различных методов построения деревьев на результаты. Делается вывод о том, что использованный геномный фрагмент и метод реконструкции оказывают гораздо большее влияние на топологию, чем наличие или отсутствие сегментации. Также проводится анализ соответствия полученных результатов с существующими гипотезами об эволюции *Acanthobdella*. Полученные результаты прекрасно иллюстрированы, их

достоверность не вызывает сомнений, а предположения и выводы полностью соответствуют полученным результатам.

В **Заключении** подытоживаются все полученные результаты. Ожидаемо, наибольшее соответствие современным представлениям о систематике и эволюции кольчатых червей показали деревья на основе полных митохондриальных геномов. Однако, фрагмент гена *COI* показал лучшие результаты для разграничения криптических видов, чем полные митохондриальные последовательности.

Результаты данной работы показывают, что топология всех деревьев на основе полных митогеномов поддерживает монофилию отрядов *Rhynchobdellida* и *Arhynchobdellida*, оспаривая результаты ранних филогенетических исследований. Подтверждается подразделенность отряда бесхоботных пиявок (*Arhynchobdellida*) на монофилетичные клады, соответствующие подотрядам глоточных (*Erpobdelliformes*) и челюстных (*Hirudiniformes*) пиявок. На уровне семейств выявляются проблемы классификации последних: роды *Haemopsis* и *Whitmania* принадлежат семейству *Haemoridae*. Однако при реконструкциях на основе полных митохондриальных геномов они формируют полифилетичную группу, разделённую представителями рода *Hirudinidae*.

Замечания

Основным замечанием по оформлению данной работы является отсутствие главы Результаты и Обсуждение как таковой. Результаты и их обсуждение представлены в двух главах, названных согласно представляемым результатам. Также недостатком работы является отсутствие объяснения выбранных маркеров. В частности гена 12S. Ген *COI* широко используется в качестве маркера для филогенетических исследований и не нуждается в объяснении, а ген 12S стоит в ряду многих других генов, которые можно использовать для филогенетического анализа. Таких как *Cytb*, *COII* и др. Тем более, что в распоряжении автора имеются полные митохондриальные последовательности, и он может выбрать любой митохондриальный ген.

Данные замечания никак не влияют на научное значение полученных результатов.

Заключение Диссертационная работа Болбат А. В. является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных конференциях, и опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью

соответствуют задачам, поставленным в исследовании. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Исходя из вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа «Структура и эволюция митохондриального генома реликтовых пиявок», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.7. – генетика», полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Болбат Александр Васильевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.7. – генетика».

В.н.с. Сектора молекулярно-генетических
механизмов регенерации, к.б.н.

Блинов А.Г.

ФГБНУ «ФИЦ, Институт цитологии и генетики» СО РАН
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева 10,
Эл. почта: blinov@bionet.nsc.ru

Ученый секретарь ИЦиГ

К.б.н.



Орлова Г.В.

Вх 2171/33
26.09.2022