

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Болбата Александра Васильевича

СТРУКТУРА И ЭВОЛЮЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

РЕЛИКТОВЫХ ПИЯВОК,

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

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 реликтовых пиявкоподобных паразитов – акантобделлид (*Acanthobdellida*). Актуальность темы несомненна в фундаментальном плане, поскольку анализ структуры и изменчивости митохондриального генома позволяет эффективно изучать генофонд важных в экологическом аспекте видов аннелид, к которым, несомненно, относятся акантобделлиды. Представители реликтовых пиявок крайне слабо изучены в отношении строения и полиморфизма их митогенома, что обуславливает новизну работы, а использование в работе репрезентативного материала по целому комплексу видов акантобделлид, отработка методов геномного анализа, оригинальные данные по структуре генома и предложенные автором филогенетические реконструкции являются приоритетными.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Текст предваряет список сокращений, основной текст состоит из Введения, глав 1 - Обзор литературы, 2 – Материалы и методы, 3 - Структура митохондриального генома аннелид, 4 – Эволюция митохондриального генома акантобделлид, а также Заключение, Выводов, Списка использованной литературы, Списка иллюстративного материала, и Приложений. Общее число страниц диссертации 137, из которых 99 составляет основной текст, остальное – список литературы из 200 источников (из них 11 на русском языке, остальные на иностранных), Список

иллюстраций и 14 Приложений, в которые вынесены: таблица со списком видов группы сравнения и характеристикой их митогеномов, порядком генов митогеномов аннелид и филогенетическими деревьями. Работа содержит 17 рисунков и 10 таблиц основного текста.

Во Введении автор подчеркивает актуальность исследования, которая заключается в важности анализа митогеномов для реконструкции эволюции различных организмов, включая аннелид, которые испытывают во многих регионах сильный антропогенный стресс. Далее описывается степень изученности проблемы, автор достаточно чётко формулирует и обосновывает поставленные цель и задачи, описывает научную новизну работы, её теоретическую и научно-практическую значимость, методологию и методы исследования. Приводятся положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов. Перечислены конференции, где представлены результаты работы, публикации, автор декларирует свое личное участие в различных аспектах работы, которое следует оценить как высокое. Описаны объём и структура диссертации.

Глава 1 – Обзор литературных источников – содержит три раздела. В первом из них (1.1.) приводятся актуальные сведения о пиявкоподобных паразитических акантобделлидах. Приводятся сведения о положении исследуемой группы в пределах аннелид. Даны морфологические характеристики и экологические особенности *Acanthobdella peledina* и *Paracanthobdella livanowi*, их ареалов и лимитирующих факторов. Обобщены работы, посвящённые изучению эволюции акантобделлид на основе морфологии и генетических данных, полученных с помощью молекулярных маркеров. Второй раздел (1.2) обобщает сведения о митохондриальном геноме животных, его структуре и изменчивости, истории её изучения, а также о проблеме аннотации митохондриальных геномов и теории тРНК-пунктуации. Заключительный подраздел посвящён использованию митохондриальных геномов в эволюционной биологии. Третий раздел Обзора содержит сведения о методах, применяемых при лабораторных и

филогенетических подходах к анализу митогеномов, в том числе NGS как самого современного и эффективного подхода. Обзор методов молекулярной эволюции и филогении (1.3.2) представляет все основные методы и модели филогенетических реконструкций.

В целом нужно отметить, что обзор литературы не только содержит практически все необходимые источники и их аналитический обзор, он хорошо структурирован, логично построен, и написан настолько качественно, что вполне может стать не только основой нескольких отдельных обзорных статей, но и вводной части монографии по собственным данным, если автор соберется впоследствии её написать. Следует дать этой части работы самую высокую оценку, автор справился с ней на «отлично». Несмотря на то, что литобзор по объёму представляет собой самую большую главу в диссертации, это не выглядит излишним, поскольку он логично показывает достижения мировой эволюционной генетики и геномики в предметной области работы, а также пробелы для выбранной таксономической группы, которые призвана заполнить работа автора.

Глава 2 посвящена описанию использованного Материала и применённых Методов исследований. Число исследованных образцов невелико, однако учитывая ресурсоёмкие геномные методы исследования и широкий охват территории, достаточны для решения поставленных задач. В разделе не указано подробно происхождение образцов, но судя по Личному вкладу диссертанта (с. 4 Автореферата): «Автором работы выполнены основные этапы исследования: экспедиционные работы по сбору образцов акантобделлид». Методы выделения и секвенирования ДНК описаны (2.2) достаточно подробно, следует позитивно отметить предосторожности, применявшиеся автором для предотвращения кросс-контаминации образцов, в том числе гетерологичным материалом хозяина. Анализ отдельных фрагментов мтДНК в сочетании с технологией Illumina следует признать удачным выбором основных лабораторных методов, адекватных цели и отвечающих задачам работы. Сборка митогеномов описана

также с достаточным уровнем детализации и с применением основных необходимых для этого программных инструментов. Удачей работы следует признать и проведённую *de novo* аннотацию (подраздел 2.4) митогеномов таксонов изученной группы. На высоком методическом уровне был также проведен также филогенетический анализ полученных геномных данных (2.5) с привлечение ряда таксономических групп сравнения и молекулярная делимитация таксонов. Важным здесь было выравнивание последовательностей с учётом возможных генных перестановок. Из методов филогенетических построений были в первую очередь задействованы методы максимального правдоподобия и байесовский подход. Выбор компьютерных программ при этом можно признать весьма удачным, что позволило получить и обработать оригинальные данные и сравнить их имеющимися в геномных БД.

В Главе 3 приведены результаты анализа структуры митохондриального генома аннелид. Полногеномные данные (3.1) получены с числом прочтений, которого оказалось достаточно для сборки митогеномов 11 из 12 образцов, выпал лишь один образец с сильно деградированной мтДНК. Для сравнения с имеющимися в мировых геномных БД автору пришлось мобилизовать все имеющиеся массивы полногеномных данных, включая «сырые» риды из базы SRA. Результаты геномной сборки были проведены при достижении хороших результатов показателей (число контигов от примерно 70000 до 950000, среднее покрытие контигов варьировало от 11 до 852, N50 для отдельных образцов - до 996). Проведён анализ зависимости статистических показателей результатов геномной сборки от количества необработанных прочтений, который показал, что увеличение числа прочтений не всегда ведёт к увеличению длины контигов и улучшению статистических показателей геномной сборки.

Поиск гомологии в GenBank позволил проанализировать природу полученных контигов, которые были получены либо единичными фрагментами, либо при возможности выстроены в порядке, определённом их взаимным перекрытием. Интересно, что все полученные митогеномы имели размер

примерно 14,5-16,0 тыс. п. н., за исключением геномов типовой акантобделлиды *A. peledina* (С.71, табл. 9), у которой все 6 образцов имели большую длину генома, достигавшую 18,5 тыс.п.н. Набор генов и генные порядки также были в целом консервативны. В то же время доля оснований ГЦ была неоднородной, при этом опять же необычно высокие, чем у пиявок для аннелид значения были обнаружены у *A. peledina*. Однако, эти значения были ниже тех, которые характерны для полихет и олигохет, что подкрепляет точку зрения на промежуточное таксономическое положение акантобделлид между пиявками и олигохетами. Обнаружено, что для аннелид порядок генов имеет таксон-специфический характер.

Аннотация митогенома *A. peledina* (3.3.2) выявила все характерные для группы гены, некоторые из которых обнаружили разные степени перекрытия, а несколько генов – тандемные повторы. Впервые показано наличие у аннелид тРНК-подобных структур, в которых, однако невозможен процессинг незрелой РНК, в том числе и из-за перекрывания нуклеотидных последовательностей.

Аннотация митогенома другого представителя реликтовых пиявок - *Paracanthobdella livanowi* показала наличие традиционного для Metazoa набора генов и некоторого перекрывания последовательностей, однако, в отличие от *A. peledina*, у этого вида отсутствует регион тандемных повторов фрагмента генов *atp6* и *trnR*. В целом же порядок генов акантобделлид оказался аналогичным характерному для большинства изученных таксонов Clitellata, включая олигохет.

Глава 4 «Эволюция митохондриального генома акантобделлид», как и остальные разделы диссертации, написана очень лаконично, но при этом весьма содержательно.

Сначала (4.1) автор приводит реконструкции по маркерным фрагментам *cox1* и *12S*. Филогенетические схемы по их сиквенсам сильно различаются по топологии между собой и не соответствуют современным представлениям о систематике и эволюции поясковых кольцецов. Низкие показатели бутстреп- и апостериорных поддержек узлов для надродового уровня свидетельствует о нестабильности полученных топологий и весьма ограниченной применимости

данных маркерных фрагментов генов для анализа древней филогении. Это наблюдение может иметь и частный характер для данной таксономической группы, однако оно заставляет задуматься в целом о невысокой ценности множества филогенетических работ на множестве представителей животных, основанных лишь на нескольких фрагментах, для реконструкций их эволюционных сценариев.

Применение алгоритма делимитации видов GMYC к байесовским деревьям по *cox1* обнаружило наибольшее соответствие предсказанных таксономических групп идентифицированным видам. В то же время на основе *I2S* этот же алгоритм показал сдвиг порогового значения внутривидовой изменчивости к корню деревьев, и как следствие, чрезмерную склонность к объединению видов, в том числе, видов разных родов, в ОТЕ.

Филогения на основе полных сиквенсов митохондриальных геномов (4.2) показала наибольшее сходство с современными представлениями об эволюции поясковых кольцецов с очень близкой и стабильной топологией деревьев. В отличие от анализа по отдельным генам, применение GMYC к байесовским деревьям по митогеномным данным показало выраженный сдвиг порогового значения внутривидовой вариабельности к листьям, и как следствие, чрезмерное дробление организмов на ОТЕ. При этом было показано, что топология при анализе полных геномов мтДНК была стабильной вне зависимости от метода реконструкции и сегментации набора данных.

В целом же реконструкция эволюционной истории на основе полных митохондриальных геномов подтвердила гипотезу о древних щетинконосных пиявках (*Acanthobdellida*) как промежуточной форме между *Oligochaeta* и *Hirudinea*, что стало одним из важнейших выводов из результатов, полученных в данной работе.

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

Автор, к сожалению, настолько сконцентрирован на анализе мтДНК, что мало внимания уделяет альтернативным гипотезам (кроме контаминации и неверных определений образцов коллегами), которые могли бы объяснить неконгруэнтность топологий филогенетических деревьев. Это могли бы быть сценарии сетчатой эволюции, которые крайне сложно анализировать, не применяя геномные исследования ядерной ДНК.

По оформлению.

Список литературы с цифровыми текстовыми ссылками несколько затрудняет интерактивный доступ к литературным источникам, поскольку для доступа к ссылке, даже если читатель уже знаком с ней, нужно постоянно обращаться к списку в конце работы.

C.125 Приложение 2 – В названиях генов правый символ для многих клеток таблицы частично обрезан краем колонки. Не даны курсивом названия родов (и вообще латынь бинарных названий видов по всем Приложениям).

Для всех ML-деревьев (Приложения 3-4, 9-10, 13-14) в цветовой гамме обозначений бутстрэп-поддержки узлов крайние значения практически неразличимы между собой визуально. На цветовых шкалах Байесовских деревьев вычислить апостериорные вероятности еще сложнее. Можно было бы дать значения выше 50% / 0,5 цифрами, традиционно при узлах.

Опечатки:

C15 A1 – Rhynchodellida => Rhynchobdellida

Подпись к Рис. 1 – *peledidna* => *peledina*

C94 Прим. к Табл.10 – «гипотИзе», причём дважды.

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 редкие незначительные недочёты, заслуживает очень высокой оценки. Оформлена работа тщательно, рисунки и таблицы наглядные и информативные.

Рассматриваемая диссертационная работа, в которой проведён анализ структуры митогеномов аннелид и филогении реликтовых пиявок, представляет собой существенный вклад в **решение ряда фундаментальных проблем** генетики, сравнительной геномики и филогеномики. При этом **практическая значимость** работы также несомненна. Материалы диссертации могут быть использованы при инвентаризации биоразнообразия, организации изучения и охраны популяций гидробионтов. Результаты работы, несомненно, найдут применение при подготовке и повышении квалификации студентов, аспирантов и специалистов в области биологии и биоинформатики в системе Минобрнауки.

В целом, нужно отметить, что автором проделан большой объем 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 («Генетика», «Изв. ИГУ. Сер. Биол»), включая три статьи в российских и зарубежных журналах (в т.ч. с достаточно высоким IF=2,288 - Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research и 2 статьи в Mitochondrial DNA Part B), реферируемых Web of Science. Результаты представлены и апробированы на семи авторитетных научных конференциях и школах, в том числе международных, проходивших в Москве, Новосибирске, Улан-Удэ и Крыму.

Таким образом, представленная Александром Васильевичем Болбатовым 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 Болбат А.В. **заслуживает** присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

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/>

26 сентября 2022 г.

Политов Дмитрий Владиславович

Подпись Д.В. Политова заверяю:

Заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, кандидат биологических наук,

26 сентября 2022 г.



Брускин Сергей Александрович