

**В диссертационный совет ПДС 0800.001 при
Федеральном государственном автономном
образовательном учреждении высшего
образования «Российский университет
дружбы народов», РУДН
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6**

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Бархатова Анатолия Сергеевича на тему «Популяционная структура комплекса среднеевропейских зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) в условиях юга Среднерусской возвышенности», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.15 – Экология

Актуальность темы диссертационного исследования

Научное исследование А.С. Бархатова посвящено проблематике сохранения биоразнообразия и изучению динамики популяций живых организмов в стремительно изменяющихся условиях окружающей среды под действием антропогенных факторов. Амфибии - одна из многочисленных модельных групп, используемых в биоиндикации и мониторинге состояния популяций, зарекомендовавшая себя в многих научных исследованиях в связи с рядом особенностей их биологии. В водных и околоводных сообществах амфибии зачастую играют ключевую роль, составляя значительную долю в биомассе водных экосистем, так как личиночные стадии амфибий проходят свое развитие в воде, которое у некоторых видов затрагивает большую часть вегетационного периода умеренных широт. Таким образом, важная характерная черта амфибий заключается в том, что состояние популяций амфибий отражает здоровье двух сред – водной и наземно-воздушной. Проницаемая для ксенобиотиков кожа амфибий делает их уязвимыми перед химическим загрязнением среды и на изменения, происходящие в окружающих условиях, амфибии чутко реагируют изменениями, происходящими в разных системах внутренних органов, что может быть использовано при биоиндикационной оценке. С другой стороны, массовость и доступность зеленых лягушек делает их удобным объектом для изучения. Для зеленых лягушек разработаны и апробированы методы отлова, учета морфологических признаков и признаков окраски, их экспресс-диагностики с помощью мультиплексной ПЦР, проточной ДНК-цитометрии, анализа состояния популяций с помощью метода гель-

электрофореза отдельных клеток (ДНК-комет), а также оценки стабильности развития на основе цитогенетических и фенетических признаков. Изучение динамики популяций амфибий в городской среде позволяет ученым делать общие прогнозы о стабильности функционирования урбоэкосистем.

Европейские зеленые лягушки рода *Pelophylax* Fitzinger, 1843 в течение длительного времени привлекают внимание исследователей, так как характеризуются рядом специфических черт биологии. Во-первых, некоторые виды данного рода обладают способностью к полуклональному размножению, которое сопровождается двумя биологическими феноменами: эндоредупликацией и элиминацией генома. Элиминация генетического материала перед мейозом наблюдается у головастиков некоторых гибридогенных форм и приводит к тому, что в предшественниках гамет сохраняется один из наборов хромосом одного из родительских видов, который как раз и проходит эндоредупликацию, таким образом, в гаметах особей сохраняется лишь геном одного из родительских видов. Данные виды при скрещивании с родительским видом, гаметы которого комплементарны, вновь образуют полуклональных гибридов и, таким образом, консервируют один из геномов, передавая его клонально. При скрещивании с родительским видом, имеющим «некомплементарные» гаметы, возможна интрогрессия генетического материала (митохондриальной ДНК), наблюдаемая в разных участках ареалов зеленых лягушек. В связи с необычным способом воспроизводства, полуклональные зеленые лягушки обитают совместно с родительскими видами и образуют т.н. «популяционные системы». С другой стороны, полуклональные формы способны к формированию диплоидных гамет и образованию полиплоидов, нередко встречающихся в популяционных системах. Такие необычные формы взаимоотношений внутри комплекса видов зеленых лягушек осложняются и тем, что на большей части Восточно-Европейской равнины существует три криптические формы озерной лягушки, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), представляющих, вероятно, три отдельных вида: центральноевропейскую озерную лягушку, *Pelophylax fortis*, анатолийскую озерную лягушку, *P. cf. bedriagae*, и балканскую лягушку *P. kurtmuelleri*. Спорадическое распространение двух последних форм связывают с инвазией озерных лягушек, происходившее и происходящее в настоящее время из-за зарыбления водохранилищ рыбами из аквакультур южных регионов. Очевидно и то, что анатолийская форма распространялась независимо от зарыбления водоемов и продвигалась с южных территорий на северо-запад, заселяя в постгляциальный период территории совместно с центральноевропейской озерной лягушкой. Такое расселение привело к формированию одной из крупнейших зон гибридизации (или вторичной интерградации, в

зависимости от взгляда на таксономический статус форм) среди бесхвостых амфибий и даже, вероятно, среди позвоночных.

Исследование данного комплекса видов несомненно представляет большой интерес, в особенности на юге Среднерусской возвышенности, так как в бассейне р. Северский Донец ранее были найдены уникальные популяционные системы с участием полиплоидных гибридов.

Научная новизна и теоретическая значимость исследования

Комплекс видов европейских зеленых лягушек детально изучен на территории Восточно-Европейской равнины и предыдущими исследованиями выявлены распространение, морфологическая изменчивость, генетические особенности родительских видов и гибридогенетических клептонов, однако интересным регионом оставался юго-запад территории, где оставалась потенциальная возможность существования новых вариантов гибридогенетических популяционных систем.

Автор впервые на территории юга Среднерусской возвышенности провел комплексное исследование популяционных систем зеленых лягушек и детально описал их экологические, генетические и морфологические особенности. В частности, впервые автор:

- 1) провел исследование популяций представителей *Pelophylax esculentus* complex с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов.
- 2) получил данные о видовом составе криптических форм *P. ridibundus* complex.
- 3) на основе микросателлитных маркеров проанализировал генетическую структуру популяций, входящих в Северско-Донецкий центр биоразнообразия зеленых лягушек.
- 4) методом гель-электрофореза изолированных клеток (ДНК-комет) оценил устойчивость озерных лягушек к действию генотоксичных поллютантов.
- 5) провел оценку микроэволюционных процессов и адаптационных механизмов в популяциях зеленых лягушек в условиях урбанизированных ландшафтов юга Среднерусской возвышенности.

Практическая значимость

Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, могут быть применены при чтении дисциплин «Зоология», «Генотоксикология», «Экологическая генетика» и «Экология животных»; собранный материал пополнил криобанк научно-исследовательского центра геномной селекции; дана рекомендация о необходимости включения в региональную Красную книгу прудовой лягушки.

Заключение о соответствии диссертации требованиям, требованиям о присуждении ученых степеней

Диссертация А.С. Бархатова изложена на 153 страницах основного текста, состоящего из введения, 7 глав, заключения, выводов и списка использованной литературы. Основной текст работы проиллюстрирован 29 рисунками и снабжен 26 таблицами. Список литературы содержит 269 источников, из них 120 иностранных источников.

В **главе 1** приводится подробный анализ научной литературы по исследуемому вопросу. Приведено рассмотрение концептуальных взглядов на природные популяции в контексте их эволюционного развития и адаптации к условиям урболандшафтов. Подробно рассмотрен гибридогенный комплекс зеленых лягушек и формирование гибридной формы *Pelophylax esculentus*. Рассматриваются экологические особенности зеленых лягушек, морфология, в том числе фенотипический полиморфизм, а также метод морфофизиологических индикаторов С.С. Шварца. Приводятся сведения по цитогенетическим и молекулярно-генетическим методам изучения популяционных систем комплекса *Pelophylax esculentus*, исследованию белкового полиморфизма, описаны методы проточной ДНК-цитометрии. Отдельное внимание уделено методу гель-электрофореза клеток, т.н. методу ДНК-комет, позволяющему оценить уровень повреждения и систему репарации ДНК в отдельных клетках.

В **главе 2** приведена подробная физико-географическая характеристика района исследований, основанная в том числе и на современных литературных источниках, что позволило обобщить сведения о геологическом строении, рельефе и почвам, климатическим и гидрологическим характеристикам. Важно отметить наличие в главе данных по флоре и фауне региона, а также техногенной нагрузке.

Глава 3 представлена материалами и методами, используемыми автором для достижения поставленных целей. Автором исследования был обработан значительный материал с территории Белгородской области, включающий 770 особей трех видов зеленых лягушек. Был пойман всего один экземпляр прудовой лягушки, что свидетельствует о ее редкости в Белгородской области или же о «выщеплении» данного вида в результате скрещивания гибридогенных *Pelophylax esculentus* (продукт гибридолиза), что представляет большой научный интерес в связи с возможностью генетической интрогрессии. В работе обобщены данные по 37 локалитетам, в которых были обнаружены зеленые лягушки, что дополняет сведения кадастра батрахофауны области. Подробно описаны методы электрофореза белков, проведения мультиплексной ПЦР, микросателлитный анализ, а также метод гель-электрофореза изолированных клеток. В конце главы автор приводит статистические методы обработки полученных результатов, проведенных с помощью пакета программ PAST V.3.1, GenAlEx v.6.5, divMigrate, NeEstimator.2.

Глава 4 включает в себя полученные А.С. Бархатовым результаты по видовой идентификации зеленых лягушек *Pelophylax esculentus* комплекса. В этой связи важно отметить, что определение видов только с помощью классических морфологических методов недостаточно для точной диагностики видов, так как нередко значения морфологических параметров и индексов перекрываются между собой у разных видов, что ведет к неверному определению таксонов зеленых лягушек. Для того, чтобы избежать ошибок в определении видов, необходимо применение молекулярно-генетических методов, что и было успешно применено автором диссертационного исследования. В ходе исследований авторами было обнаружено, что озерные лягушки представлены двумя таксонами – центральноевропейской *Pelophylax ridibundus* (= *P. fortis*) и анатолийской формой, *P. cf. bedriagae*. Аллели этих форм найдены и у съедобной лягушки. Для прудовой лягушки обнаружена интрогрессия генетического материала от *P. cf. bedriagae*, что свидетельствует в пользу ее «гибридолизного» происхождения.

Глава 5 посвящена морфологической характеристике особей из популяционных систем, рассматривая стандартные параметры и индексы, а также фенотипическую изменчивость особей. Автором отмечено, что при анализе морфометрических признаков обособленное положение занимает группа «Северский Донец», что соответствует и полученным с помощью микросателлитного анализа данным. В главе также приводятся сведения по окраске лягушек и фенотипическому полиморфизму, выявлены показатели фенотипического разнообразия и доли редких морф. Выявлено изменение частот фенотипов и повышение доли редких морф в градиенте антропогенной нагрузки в трансформированных биотопах. Важной вехой в проделанной работе оппонент считает приведенные данные по морфофизиологическим индикаторам, показывающим степень изменения индексов внутренних органов: было обнаружено заслуживающее внимания отсутствие прямой взаимосвязи с антропогенно трансформированными биотопами, что автор диссертационного исследования связывает с генетической гетерогенностью представителей комплекса.

В **главе 6** приведен анализ генетической структуры популяционных систем на основе молекулярно-генетических маркеров (локусов изоферментов и микросателлитных маркеров). В главе приводится рассмотрение полиморфизма особей в популяционных системах, оценен уровень потока генов между популяциями зеленых лягушек, обитающих в различных речных бассейнах, обсуждается возможность миграции особей между популяционными системами, оценена эффективная численность популяций. Приведена также оценка генетического разнообразия у ювенильных и половозрелых возрастных групп, что кажется весьма полезным для понимания целостной картины генетической

структуры популяций. Автор диссертационного исследования обнаружил высокий уровень генетического разнообразия, который он связывает с преобладанием гибридных и интрогрессивных особей, объясняя его адаптивной реакцией популяций на нестабильные условия среды обитания.

В главе 7 приводится анализ повреждений ядерной ДНК у озерных лягушек с помощью метода ДНК-комет. Автор приводит сведения об уровне повреждений ядерной ДНК лягушек в техногенных урболандшафтах г. Белгорода и прилегающих территориях, испытывающих влияние разных антропогенных факторов, в том числе и химическое загрязнение биотопов. Обнаруженные высокие уровни повреждений свидетельствуют о негативном влиянии поллютантов на городские экосистемы, которые могут коснуться менее устойчивых компонентов экосистем и, в конечном итоге, вести к общему снижению биоразнообразия.

Изложение материала завершается двумя заключительными разделами «Заключение» и «Выводы».

В **Заключении** автор подводит итог многолетнему исследованию интересной группы земноводных, обобщая полученные результаты, и приходит к выводу о вынужденных миграциях амфибий вследствие деградации экосистем, увеличению уровня гибридизации и интрогрессии, возникновению сложных взаимодействий внутри популяционных систем, что может быть проявлением адаптивной реакции на нестабильные условия обитания.

Выводы в полной мере отражают поставленные задачи. В них автор кратко и емко формулирует полученные результаты, выступает с предложением внести прудовую лягушку в региональную Красную книгу, описывает полученные результаты по морфологической, генетической изменчивости популяционных систем, морфофизиологического состояния особей, обобщает результаты микросателлитного и аллозимного анализа, а также данные об уровне повреждения ядерной ДНК по методу ДНК-комет.

Автором, несомненно, проделана большая работа, заслуживающая внимания исследователей в области герпетологии, популяционной генетики и экологии популяций.

Несмотря на отмеченные достоинства диссертационного исследования, у оппонента есть некоторые замечания, несколько не умаляющие его заслуги в проделанной работе.

- 1) Автор не приводит исследование ploидности особей, которое можно осуществить с помощью проточной ДНК-цитометрии или же на основе морфометрических

показателей эритроцитов, которые статистически значимо больше у триплоидных экземпляров.

- 2) Мультиплексная ПЦР система, использованная автором, к сожалению, не позволяет выявить балканскую форму *Pelophylax kurtmuelleri*, которую можно диагностировать с помощью секвенирования фрагментов генов *SAI-1*, *ND2* и *COI*, поэтому автор не приводит данных по этому таксону, который наверняка будет обнаружен в дальнейших исследованиях на данной территории.

- 3) Опечатки:

Стр. 25, 10 строка, *P. cf. Bedriagae*, должно быть *P. cf. bedriagae*

Стр. 107, строка 23 «достоверно значимых отличий» следовало бы заменить на термин «статистически значимых».

Стр. 12, строка 5, пропущена запятая между «диплоидными» и «триплоидными».

- 4) Стр. 11, последний абзац, важно было бы при описании таксонов где-либо в тексте указать полные латинские названия видов, озерная лягушка – *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), прудовая лягушка – *P. lessonae* (Camerano, 1882), съедобная лягушка – *P. esculentus* (Linnaeus, 1758).
- 5) Стр. 12, последний абзац, семь типов популяционных систем можно выделить на большей части Восточно-Европейской равнины, а в европейских популяциях классификация немного меняется в связи с появлением полиплоидов.
- 6) В описании статистических методов нет указания на методы, используемые в работе (кластерный анализ, критерий Краскелла-Уоллиса, «хи-квадрат» критерий. Метод главных компонент и т.д.) и не приведено обоснование выбора методов непараметрической статистики, используемых при анализе результатов.

Диссертация изложена грамотным литературным языком. Встречаются неизбежные мелкие ошибки и опечатки. Однако отмеченные недостатки не влияют на основные теоретические и практические результаты и не снижают в целом благоприятного впечатления. Диссертация А. С. Бархатова «Популяционная структура комплекса средневропейских зеленых лягушек (*Pelophylax esculentus* complex) в условиях юга Среднерусской возвышенности» заслуживает высокой оценки. Материалы доложены на пяти всероссийских и международных конференциях и симпозиумах. По теме диссертационного исследования опубликовано 10 работ, в том числе 5 статей, входящих в перечень ВАК и индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

В итоге можно сделать вывод, что диссертация Анатолия Сергеевича Бархатова на тему: «Популяционная структура комплекса средневропейских зеленых лягушек

(*Pelophylax esculentus* complex) в условиях юга Среднерусской возвышенности» может считаться законченной научной квалификационной работой. Диссертация соответствует требованиям раздела II Положения о присуждении ученых степеней Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (РУДН), утвержденного Учёным советом РУДН, протокол № 12 от 23.09.2019, а её автор, Анатолий Сергеевич Бархатов, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности наук 1.5.15 – Экология.

Официальный оппонент,

Свинин Антон Олегович

Кандидат биологических наук (03.02.04 - Зоология)

Старший научный сотрудник

Лаборатории экологической генетики и метагеномики

Института экологической и сельскохозяйственной биологии (Х-БИО)

ФГБАУ ВО «Тюменский государственный университет»

625003 Тюмень, ул. Ленина, 25

Тел. +7 (987) 713-17-57

E-mail: ranaesc@gmail.com

01.11.2022



Свинин А.О.

Подпись Свинина Антона Олеговича заверяю

