

Никулина Вячеслава Юрьевича «Филогенетические отношения в роде *Sedum* L. (Crassulaceae J.St.-Hil.) и в близких ему родах на основании сравнения нуклеотидных последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа В.Ю. Никулина посвящена одному из широко всесветно распространенных растений рода *Sedum* семейства Crassulaceae. Выбор этой группы как объекта исследования был очень удачным и интригующим: род, будучи полифилетическим, включает несколько монофилетических групп, что вызывает немалый интерес. Несмотря на то, что оказалось практически невозможным охватить все разнообразие семейства, были охвачены основные группы, ключевые в систематике толстянковых. Помимо того, что очитки распространены почти всесветно, они играют важную роль в биоценозах, что определяет актуальность исследования.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из «Введения», «Литературного обзора», «Материалов и методов», «Результатов», и «Обсуждения», поделенного на 2 раздела, соответствующих целям работы, «Выводов», «Списка литературы» и «Приложения», включающего табличный материал. Объём диссертации без приложений - 104 страниц, суммарный объём - 114 страниц. Библиографический список включает 195 источников, из них 180 на иностранных языках.

Актуальность темы. Crassulaceae J.St.-Hil. (толстянковые) – семейство цветковых растений, включающее около 1400 видов, распространенных по всему земному шару. Основными центрами разнообразия семейства считаются Мексика, Средиземноморье, Южная Африка, Макаронезия и Восточная Азия. Представители семейства популярны как декоративные, комнатные и лекарственные.

Систематика толстянковых имеет долгую историю, однако классификация внутри семейства до сих пор остается объектом дискуссии. Большое морфологическое разнообразие и гомоплазия фенотипических признаков, используемых в систематике, затрудняют реконструкцию филогенетических отношений и построение естественной системы семейства Crassulaceae.

Таксономические проблемы семейства сконцентрированы главным образом в родовой и внутриродовой классификации подсемейства Sedoideae и его типового рода *Sedum*. Род *Sedum* характеризуется большим, около 420, числом видов, отличающихся высоким морфологическим разнообразием и широким ареалом. В *Sedum* часто включали виды, не подпадающие под диагнозы других родов, и в настоящее время он объединяет около 30% видового разнообразия семейства. Однако, в большинстве исследований толстянковых с использованием молекулярных маркеров, многие представители рода либо не были представлены вовсе, либо выборки включали небольшое число видов. Таким образом, несмотря на центральное положение в семействе, род *Sedum* до настоящего времени остается слабо изученным, и его филогенетические отношения с другими представителями семейства Crassulaceae невыясненными.

Достоверность и научная новизна полученных результатов, выводов, научных положений. В ходе исследования получено 85 последовательностей ITS региона и 44 – участка гена *matK*, большинство из которых принадлежало представителям проблемного рода *Sedum* (71 и 35 последовательностей соответственно). Были построены и проанализированы модели вторичных структур транскриптов спейсерных участков ITS1 и ITS2 рДНК. Показано, что данные модели соответствуют универсальным моделям ITS растений. Изучены филогенетические отношения в вершинной группе семейства толстянковые (трибы Aeonieae, Semperviveae и Sedeae) на основании наиболее представительной на сегодняшний день выборки, включающей 223 последовательности

ITS региона (из них 140 принадлежат представителям изучаемого рода *Sedum* (120 видов)) и 102 последовательности гена *matK* (из которых 71 принадлежит представителям *Sedum* (57 видов)).

Достоверность результатов обеспечена использованием современных молекулярно-филогенетических методов, обработкой полученных данных с помощью адекватных методов максимального правдоподобия и Байесовского вывода. Были проанализированы не только последовательности ДНК двух маркеров, но и полученные из GenBank последовательности *Sedum* и близких родов (138 последовательностей ITS региона и 58 – участка гена *matK*). Для подтверждения результатов исследования приведены табличные данные, диаграммы, филогенетические деревья и модели вторичных структур.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Обоснованность и достоверность сформулированных научных положений и выводов обеспечена большой выборкой исследованного автором материала и использованием большого количества данных, которые были получены Вячеславом Юрьевичем с использованием самых современных методов исследования. Основные положения и результаты диссертации были представлены и обсуждались на научных конференциях во Владивостоке, Москве и Санкт-Петербурге. Соискателем лично получен и обработан экспериментальный экспедиционный материал. Соискатель принимал активное личное участие в научном анализе полученных данных, подготовке научных публикаций и представлении материалов на научных конференциях.

Научное и практическое значение полученных результатов.

Результаты исследования вносят существенный вклад в область систематики и филогении растений. Работа может служить фундаментальной основой для проведения ревизии таксономической структуры триб Aeonieae, Semperviveae и Sedeeae в целом, и рода *Sedum* в частности. Полученные результаты важны для понимания микроэволюционных процессов, происходящих в геноме растений. Результаты диссертационной работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов биологических специальностей ВУЗов и для проведения практических занятий.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных трудах.

Основные результаты диссертационной работы достаточно полно опубликованы автором в ведущих научных изданиях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Наиболее важные положения по главам.

Первая глава. Обзор литературы. Дана довольно развернутая история развития представлений о систематике семейства Crassulaceae и рода *Sedum*. Приведен обзор используемых молекулярных маркеров, описана природа внутренних транскрибируемых спейсеров, описаны подходы моделирования вторичной структуры ITS региона и механизмы его эволюции. Изложены сведения о применении гена *matK* в филогенетических исследованиях.

Вторая глава. Материалы и методы. Достаточно полно описаны использованные методы и материалы. Они полностью адекватны и достаточны для решения поставленных задач.

Третья глава. Результаты. Дана характеристика последовательностей фрагментов ITS и *matK*, описаны полученные структуры ITS1 и ITS2. Изучена матрица, состоящая из 223 последовательностей этого региона. Приведены соотношения длин и содержание ГЦ-оснований во внутренних транскрибируемых спейсерах изученных родов толстянковых. Отмечено практически полное отсутствие в них консервативных участков, что затрудняет выравнивание. Во втором подразделе представлены результаты моделирования вторичных структур. Показано, что структуры ITS1 и ITS2 характеризуются наличием 4

спиральных и 4 одноцепочечных участков, однако длина спиралей и наличие некоторых из петель являются специфичным признаком для некоторых из исследованных таксонов. Спейсер ITS2 оказался более консервативным, большая часть его оснований включена в спирали, нежели в петли. Проанализирована матрица последовательностей по маркеру *MatK* из 102 последовательностей, 71 из которых относится к роду *Sedum*.

Изложены результаты филогенетического анализа, проведенного как при использовании отдельных маркеров, так и объединенной последовательности. Корректно выбраны соответствующие эволюционные модели и проведены филогенетические реконструкции. Стоит отметить удачную форму подачи индексов поддержки бутстрепом в виде таблиц, что сильно упрощает сравнение уровней поддержки клад, полученных при помощи различных подходов.

Четвертая глава. Обсуждение. Два раздела главы соответствуют заявленным задачам: в первом обсуждаются особенности вторичной структуры транскрибируемых спейсеров, во второй – филогения рода *Sedum*.

Была обнаружена высокая вариабельность вторичной структуры ITS региона рДНК толстянковых. Показано, что вариации спейсеров по длине играют важную роль в эволюции толстянковых. При большой их вариабельности, происходящие в ходе эволюции изменения не приводят к изменениям в созревании рРНК.

Полученные топологии филогенетических древ согласуются с результатами предыдущих исследований. Вне зависимости от того, какие последовательности анализировались, установлены одни и те же в равной степени хорошо поддержанные клады. Это говорит о том, что эти построения, основанные на маркерах, имеющих различную эволюционную историю, позволяют выдвинуть достаточно достоверную гипотезу о филогении исследуемой группы толстянковых.

Показано, что виды рода *Sedum* вошли во все монофилетические клады Crassulaceae, представляющие все трибы толстянковых, что говорит о его искусственности. Подтверждена до сих пор игнорируемая систематиками близость североафриканских и макаронезийских седумов. Не обнаружена достаточная поддержка предложенных ранее клад *Monanthoidea* и *Sempervivum*. Отмечено, что седумы американской трибы *Echeverioidea* демонстрируют высокое фенотипическое разнообразие на фоне низкой генетической изменчивости.

Заключение. Рассмотрены три типа решения таксономической проблемы, вытекающей из полифилии рода *Sedum*. Две из них предполагают расширение рода фенотипически отличными видами, третий же предполагает признание многочисленных монофилетических групп отдельными родами, тогда как *Sedum* окажется монотипическим родом с единственным видом *S. acre*. Все эти три модели вполне жизнеспособны, и вопрос о выборе одной из них стоит за систематиками, которые, на мой взгляд, должны будут руководствоваться не только филогенией, но и принципом стабильности номенклатуры и рациональностью создаваемой системы.

Выводы. Их количество на два превышает количество поставленных задач, что необычно для квалификационной работы. При этом, вывод №1 соответствует задачам №1 и 2. Остальные четыре вывода соответствуют задаче №3. Традиционно, некоторые эксперты считают такую картину мало приемлемой, однако я в этом не вижу проблемы. Все четыре последних вывода четко соответствуют поставленной цели, тогда как объединение их в один вывод, сделало бы его чрезмерно громоздким. Поэтому, диссертант, на мой взгляд, вполне рационально и правильно поступил, разбив их на четыре отдельных вывода. Можно было бы и изменить число задач, но тогда они бы звучали как «масло масляное», «масляное масло», «масло с маслом» и т.д. – что быть может, формально правильное, но полностью лишено рационального смысла. Из текста и структуры диссертации очевидно, что диссертант четко представляет поставленную

задачу и поделал адекватную работу – и этого, на мой взгляд, более важно для оценки его научного исследования.

Замечания к содержанию диссертации. В работах, затрагивающих вопросы таксономии, к которым можно отнести и диссертацию Вячеслава Юрьевича, принято первое упоминание латинских названий таксонов сопровождать их авторами и годом публикации, что в тексте диссертации не выдержано. Диссертант часто использует сокращения фамилий авторов, не указывая годы описаний вовсе. Это делает, с таксономической точки зрения, работу недостаточно информативной: некоторые ее фрагменты впоследствии возможных будущих таксономических ревизий, могут лишиться смысла. Да и сокращения фамилий имело рациональный смысл в 19 веке, тогда как при технологиях 21 века, это выглядит не более, чем декоративной архаикой.

На протяжении всей работы, использованный в ней молекулярный маркер *matK* именуется «геном». Но в данном случае применим термин «маркер», так сравниваемые нуклеотидные последовательности являются неполными последовательностями гена *matK*. Помимо этого, в работе не изучался собственно ген – использовались лишь его нуклеотидные последовательности как носители признаков. Изучались же растения и их эволюция.

Материалы и методы. Недостаточно обоснован выбор 10 млн. генераций цепей Маркова при байесовском анализе. Возможно, для анализа достаточно, скажем, 5 млн. Я бы рекомендовал использовать программу Tracer для тестирования выхода значений правдоподобий на плато.

Результаты. Описание принципов выбора оптимальной вторичной структуры спейсеров уместнее было бы поместить в главу «Материалы и методы».

Таблицы 20 и 21 представляют собою очень важное наблюдение, однако они имеют мало общего с поставленной задачей – изучением филогенетических отношений. Собственно, и в выводах диссертации результаты этого анализа никак не отражены. Эти результаты несомненно важны при выполнении задачи выяснения уровней межвидовой дивергенции и разделения видов, однако такой задачи перед диссертантом не стояло. Такая задача находится в области не молекулярной филогенетики, а ДНК-штрихкодирования – несколько иной науки с совершенной другой философией и задачами, хотя и обладающей отчасти схожей методологией. Диссертанту либо следовало выделить эту задачу отдельно, уделив ей больше внимания (осветив проблемы ДНК-штрихкодирования в литературном обзоре, его методы в Материалах и методах, изложив соответствующие результаты адекватных тестов в «Результатах»), либо не затрагивать ее вовсе. Быть может, это было сделано «традиционно», в духе работ других авторов, но тогда стоит напомнить диссертанту о том, что традиция не является элементом научной методологии. Это культурное явление, но никак не научное и не может быть научным аргументом.

Предложение «В то же время, монофилия подклад *Sempervivum* s. l. (Klein, Kadereit, 2015) и *Sedum* ser. *Rupestris*, слагающих трибу, не вызывает сомнения» неудачно составлено, скрадывая смысл сказанного – ведь речь идет не о монофилии этих клад, а о монофилии, объединяющей их кладу (трибу).

Список литературы. Имеется совсем мелкое замечание: в списке литературы не все работы идут в хронологическом порядке. Так, за Mort et al., 2010 следуют Mort et al., 2001 и Mort et al., 2002.

Закключение. Диссертация Никулина Вячеслава Юрьевича представляет собой законченную научно-квалификационную работу по актуальной теме. Указанные выше замечания я бы считал несущественными: некоторые из них приведены мною с целью указать хоть какие-то – в частности, два последних. В настоящее время, во всем мире выходит огромное количество публикаций, грешащих куда более значительными

недоработками, остающимися незамеченными рецензентами и редакторами даже в весьма солидных изданиях. На этом фоне, назвать недочеты работы Вячеслава Юрьевича чем-то, заслуживающим большого внимания, было бы попросту нелепо и цинично. Быть может, я был недостаточно внимателен, но я не нашел ни одной ошибки, либо опечатки в тексте – даже при использовании программных средств. Список литературы соответствует ссылкам в тексте. В целом, работа читается как небольшая увлекательная монография, написанная в довольно неплохом стиле.

Основываясь на детальном анализе диссертации, учитывая уровень публикаций, принимая во внимание доклады по теме диссертации на научных конференциях, считаю, что Диссертационная работа «Филогенетические отношения в роде *Sedum* L. (Crassulaceae J.St.-Hil.) и в близких ему родах на основании сравнения нуклеотидных последовательностей ядерной и хлоропластной ДНК» соответствует основным квалификационным критериям (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Никулин Вячеслав Юрьевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика.

Официальный оппонент,
научный сотрудник
Лаборатории молекулярной систематики
Ниционального научного центра морской биологии ДВО РАН
кандидат биологических наук
по специальности 03-02-07 - Генетика
E-mail: anton.chichvarkhin@gmail.com

«22» сентября 2017 г.

Чичвархин Антон Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Нициональный научный центр морской биологии ДВО РАН (ННЦМБ ДВ РАН)
Пальчевского 17,
Владивосток, 690041
Тел. (423) 231-09-05
Факс (423) 231-09-00
E-mail · inmarbio@mail.primorye.ru

Подпись Чичвархина А.Ю. удостоверяю
Ученый секретарь ННЦМБ ДВО РАН
к.б.н.

Жуков В.Е.

