

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кремнева Георгия Артуровича "Жизненные циклы, филогения и эволюция трематод семейств Acanthocolpidae и Brachycladiidae (Digenea: Brachycladiidae)", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология.

Актуальность темы. Исследования жизненных циклов трематод представляет собой важнейшее направление в изучении этой группы паразитических плоских червей. Расшифровка жизненных циклов трематод представляет собой единственный инструмент для выявления путей циркуляции разных видов трематод и подтверждения их таксономического статуса. Очевидно, что такие исследования важны для раскрытия путей становления жизненных циклов трематод, что позволяет проследить эволюционную историю не только самих паразитов, но и их хозяев. С другой стороны, результаты таких исследований полезны в прикладных областях медицины и гельминтологии, позволяя выявлять потенциальные очаги распространения паразитарных инфекций и их носителей. Ценность работы Георгия Артуровича в том, что он в своей работе применил комплексный подход к расшифровке жизненных циклов изучаемых видов трематод, включая как глубокий анализ морфологии представителей разных стадий, так и оценку изменчивости нуклеотидных последовательностей ДНК. Важно также, что в качестве объектов исследования выбраны трематоды, циркулирующие в морских биотопах, в то время как основная масса работ по расшифровке жизненных циклов трематод выполняется для пресноводных видов червей, поскольку для них проще воспроизвести жизненный цикл в лабораторных условиях. Выбор морских видов трематод в качестве объектов исследования позволил Георгию Артуровичу в полной мере показать эффективность молекулярных методов расшифровке жизненных циклов трематод, воспроизведение которых в лабораторных условиях весьма затруднительно, хотя и возможно. При этом Артур Георгиевич весьма детально проанализировал морфологию личинок, партенит и марит изучаемых видов трематод, что, на мой взгляд, категорически необходимо ввиду актуальности проблемы несогласованности морфологических и молекулярных данных для трематод в настоящее время.

Основные положения, выносимые на защиту, в целом сформулированы достаточно корректно и грамотно. Тем не менее, первое положение в представленной формулировке выглядит достаточно очевидным, потому что возникновение и распространение того или иного вида дигеней так или иначе связано с реорганизацией жизненного цикла его предковой формы. В данном положении важно кратко подчеркнуть характеристики

предкового варианта жизненного цикла, о котором идет речь, и для каких групп трематод он характерен.

Цель и задачи. В целом цель и задачи диссертационной работы изложены достаточно грамотно. Однако некоторые задачи сформулированы таким образом, что не ясно, предполагается ли экспериментальная работа в рамках диссертации; на основании каких данных автор планирует решать эти задачи. Кроме того, задача №2 не обоснована во введении.

Новизна научных результатов. Научные исследования по расшифровке жизненных циклов трематод, циркулирующих через представителей морской фауны, в мировой литературе встречаются крайне редко. Поэтому в целом представленные в рамках диссертации результаты, несомненно, характеризуются новизной. Очевидная новизна также в том, что впервые представлено детальное описание представителей разных стадий жизненных циклов представителей Acanthocolpidae – трематод рода *Neophasis*, получены молекулярные данные для представителей каждой стадии, а также выявлены промежуточные хозяева для этих видов трематод. В качестве новизны Георгий Артурович приводит следующий тезис: «Показано, что онтогенез гермафродитного поколения *N. anarrhichae* представляет собой непрерывный процесс: личинки могут полностью завершать свое развитие и приступать к яйцепродукции все еще находясь в единственном промежуточном хозяине — гастроподe *B. undatum*. Таким образом, для этого вида потенциально возможна гомоксенная реализация жизненного цикла.» На основании этих результатов можно ли сказать, что для жизненного цикла данного вида трематод доказано наличие прогенеза? Это бы значительно усилило новизну представленных результатов.

Степень достоверности научных результатов. В работе использован значительный набор методов и подходов к расшифровке жизненных циклов трематод, включая прижизненное наблюдение, гистологию и микроскопию разных уровней, а также анализ молекулярных данных, что, несомненно, соответствует мировому уровню научных исследований. Объем обработанного материала весьма впечатляет и однозначно указывает на высокую достоверность полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и приложения. Основная часть работы изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 225 наименований (33 на русском языке). Приложение к работе (4 страницы) содержит 2 таблицы. Основные главы диссертации построены по типу научных статей и содержат «Результаты» и

«Обсуждение», что позволяет максимально полно оценить представленный в главе материал, результаты и их интерпретацию.

Согласованность автореферата и диссертации. Автореферат полностью соответствует тексту рукописи диссертации, основные результаты изложены в краткой форме и при этом позволяют оценить объем проделанной работы и достижение автором цели научного исследования.

Ниже приведу основные достоинства и недостатки диссертации по главам.

Глава 1 «Обзор литературы» написана довольно основательно и позволяет оценить широту и глубину освоения автором диссертации научной литературы по теме. При этом информация, представленная в данной главе, позволяет в полной мере оценить имеющийся по прорабатываемой научной проблеме задел и существующие вопросы и проблемы. Тем не менее, у меня имеется единственное замечание к содержанию главы 1. Автор периодически высказывает свое мнение относительно результатов, изложенных в тех или иных работах что, на мой взгляд, излишне для литературного обзора. Для этого существует глава «Обсуждение», в рамках которой предоставляются неограниченные возможности для оценки и интерпретации литературных данных. Если автор диссертации подтвердил «несогласие» с литературными данными собственными публикациями, то в рамках литературного обзора в принципе допустимо их изложение с примерной формулировкой «Новые данные подтверждают или не подтверждают результаты, полученные таким-то автором» с указанием ссылок на собственные публикации. Также есть пара мелких замечаний, например, на странице 37 сказано, что *«Помимо желез проникновения, личинки Cercaria dipteroerca снабжены еще тремя парами железистых клеток, которые были выявлены только на гистологических срезах (Miller, Northup, 1926; обозначены буквой “с” на рисунке 7).»*. Рисунок 7 находится в главе "Результаты", ссылка на него в обзоре литературы неуместна, поскольку неясно, где и как долго искать этот рисунок. Если эти результаты опубликованы, то нужно сослаться на соответствующую публикацию. На странице 50 изложена информация о хозяевах трематод Acanthocolpidae, а также о местах их локализации внутри организма хозяина. При этом не представлено ни одной ссылки на литературные источники: автор ссылается лишь на таблицы 1 и 2, создавая впечатление, что излагаются собственные результаты, хотя мы знакомимся с обзором литературы. Все-таки в рамках научного труда, тем более диссертационной работы лучше ссылаться на конкретные литературные источники, чем только на таблицы. Таблицы удобны для обобщения данных, автор категорически правильно поступил,

объединив объемные данные в виде таблиц. Однако у этих самых данных есть конкретные авторы, на которых нужно ссылаться при изложении информации в тексте.

Глава 2. Материалы и методы. Данная глава в целом написана довольно подробно, изложены характеристики всех использованных методик, а также дана информация о количестве вскрытых рыб и моллюсков. Однако нигде нет обобщающей информации о количестве собранных червей, хотя бы общее количество, включая все формы, не говоря о кол-ве марит, метацеркарий, редий и т.п. Количество обследованных экземпляров моллюсков и рыб, конечно, впечатляет, но хотелось бы увидеть объем фактического материала, использованного в работе.

В характеристиках молекулярных методик имеется ряд мелких недостатков. Например, не указаны концентрации праймеров для ПЦР, а также концентрация бромистого этидия для окрашивания гелей. Также нет информации о составе смеси для ПЦР Screen Mix-HS либо хотя бы указания на то, что ПЦР с этой смесью проводилась в соответствии с протоколом производителя.

На странице 63 сказано, что: *«В тех случаях, когда повторяющиеся области препятствовали выравниванию, их исключали»*; то есть были выявлены повторяющиеся области, в данном случае для фрагмента ITS1 рДНК. В случаях обнаружения повторов, как правило, дополнительно проводится амплификация и секвенирование этих же фрагментов. Проводились ли такие процедуры? Кроме того, наличие повторов может выступать дополнительным маркером меж- и внутривидовой дифференциации, исключать их из анализа полностью нежелательно.

На этой же странице: *«Для проверки качества полученных белок-кодирующих нуклеотидных последовательностей мы транслировали их в белок»*. Лучше написать *«в аминокислотную последовательность»*, поскольку белок представляет собой целостную функциональную единицу, упакованную в сложную структуру, а в данном случае использован фрагмент первичной аминокислотной последовательности.

Страница 64: *«Подбор оптимальной эволюционной модели для каждого выравнивания был выполнен в программе MEGA 11 с помощью алгоритма максимального правдоподобия»*. Вычисление функции правдоподобия - это часть алгоритма выбора эволюционной модели. Выбор оптимальной эволюционной модели осуществляется на основании рассчитанных функций правдоподобия с помощью информационных критериев Акейки или Байеса (Akaike, 1974; Ronquist et al., 2012). В данном случае не ясно, какой из критериев был использован.

В названии таблицы 4 отмечено, что: *«Во всех реакция время начальной денатурации составляло 5 минут при 95 °C, а время окончательной элонгации — 10 минут при 72 °C.»*. Это противоречит информации в самой таблице, где указано, что из соответствующих литературных источников использованы праймеры и условия (видимо имеются в виду все условия). Условия ПЦР у разных авторов разные, включая первичную денатурацию и дополнительную элонгацию. Поэтому необходимо отметить в примечании, что, например, «каждая процедура ПЦР выполнена в условиях, указанных в такой-то статье, с собственной модификацией».

Отдельного внимания заслуживает повсеместное использование автором слов «сиквенс» относительно нуклеотидных последовательностей ДНК и «отсеквенированный» относительно видов трематод. Эти слова, как правило, используются в разговорной речи в качестве «сленговых» выражений и категорически не пригодны для использования в русскоязычном научном тексте.

Глава 3. Жизненные циклы трематод из семейства Brachycladiidae, строение их партенит и личинок. Глава содержит результаты исследования морфологии личинок и партенит трематод Brachycladiidae, а также результаты сравнительного анализа представителей разных стадий жизненного цикла изучаемых видов трематод по молекулярным данным. Анализ морфологии выполнен максимально глубоко и основательно, получены подробные данные о строении личинок и партенит с использованием различных гистологических методик, что не вызывает сомнений в ценности достоверности полученных результатов. Однако немного смущает отсутствие данных о морфологии марит изучаемых видов трематод, притом, что размерные характеристики половозрелых особей представлены в таблице.

Молекулярный анализ выполнен в целом адекватно, филогенетические деревья интерпретированы в соответствии с базовыми понятиями филогенетики. Тем не менее, следует отметить, что таксономические выводы основаны на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей ДНК, полученных автором для партенит и личинок, и последовательностей ДНК для марит, опубликованных в Генном Банке другими авторами. Здесь невозможно не отметить исключительное доверие автора к молекулярным данным, опубликованным в генном банке другими авторами и видовой идентификации трематод, для которых эти данные были получены. Как показывает практика, довольно значительный объем молекулярных данных, представленный в геном банке, не подкреплён данными морфологии, подтверждающими принадлежность той или иной трематоды к заявленному виду. Даже если морфология представлена, эти данные следует, по крайней мере, проработать относительно достоверности видовой идентификации. Эта

проблема имеет масштабный характер, потому в настоящее время необходимо применять максимальные меры для того, чтобы избежать ошибок и неточностей в интерпретации собственных результатов. По сути, выводы автора относительно видовой принадлежности личинок и партенит и, следовательно, гипотетические схемы жизненных циклов трематод находятся в большой зависимости от того, насколько достоверны молекулярные данные по маритам, представленные в геном банке другими авторами. Поскольку собственные данные морфометрии для половозрелых особей трематод все-таки имеются, ничего не мешало представить в диссертации данные морфологии, хотя бы краткое описание и рисунок мариты анализируемого вида, что сняло бы любые вопросы относительно видовой принадлежности изучаемых трематод.

На странице 72 отмечено, что «Значения генетической дистанции между изолятами стадий жизненного цикла *O. arcticus* близки к нулю (Приложение, Таблица 1).» Исходя из данных, представленных в таблице 1, разброс значений генетических дистанций для разных изолятов *O. arcticus* составляет от 0.01 до 0.15 (к сожалению, не указаны единицы измерения, доли или %). Тем не менее, вне зависимости от единиц измерения, очевидно, что значения дистанций различаются на порядок. То есть представители разных стадий жизненного цикла одного вида трематод различаются по молекулярным данным. Это интересный результат, хотелось бы видеть более глубокий анализ (хотя бы количество и типы замен, а также результаты, исключающие наличие сомнительных сайтов в результате, например, плохого прочтения последовательностей). Более того, не факт, что обнаруженные редии и метацеркарии, а также марита, использованная в анализе из Генбанка, на самом деле принадлежат к одному и тому же виду (отсылка к замечанию выше). Поскольку между разными формами обнаружены молекулярные различия, нужны более надежные доказательства их конспецифичности, например, результаты воспроизведения жизненного цикла.

На этой же странице: «Полученное филогенетическое дерево, основанное на анализе последовательностей гена *pad3*, включало три крупные клады с низкими значениями бутстреп-поддержки и апостериорной вероятности (Рисунок 2).» На рисунке 2 не у всех клад поддержки низкие. Например, клада Brachycladiidae хорошо поддержана на дереве, построенном с помощью алгоритма Байеса, а клада Acanthocolpidae В - высоко поддержана на деревьях, реконструированных как с помощью алгоритма максимального правдоподобия, так и с помощью алгоритма Байеса.

На странице 73, п.гл. 3.4 «Морфологические описания и данные о зараженности». Описание редии начинается с того, что они «паразитируют в гонаде и гепатопанкреисе моллюска-хозяина.» Эта информация должна быть выше описания: «локализация - гонада,

гепатопанкреас моллюска-хозяина.» Это замечание актуально для остальных описаний по всему тексту.

На этой же странице: «*Ротовое отверстие расположено терминально,...*». Слово «расположено» в данном случае лишнее. Описание должно быть строго лаконично, телеграфным стилем: «Ротовое отверстие терминальное», «Родильная пора позади глотки» и т.д. Замечание актуально для остальных описаний по всему тексту.

На странице 76 сказано, что «*Церкарии покидают редий вскоре после закладки хвоста и пигментированных глаз. Морфогенез личинок завершается в тканях моллюска-хозяина.*» Не совсем понятно, каким образом это установлено? В главе «Материал и методы» об этом ничего не сказано.

П.гл. 3.5 «Обсуждение» начинается с того, что «*Анализ последовательностей фрагментов рибосомального оперона (18S рДНК, ITS1) и гена nad3 мтДНК, а также основанная на nad3 филогенетическая реконструкция, однозначно показали, что редии и церкарии с пигментированными глазами из *Cryptonatica affinis* и метацеркарии из двустворчатых моллюсков являются стадиями жизненного цикла *Orthosplanchnus arcticus* из семейства *Brachycladiidae*.*» Отмечу, детальный анализ последовательностей гена *nad3*, по которому выявлены различия между редиями с одной стороны и маритами/метацеркариями - с другой, не был выполнен. Церкарии вообще не были проанализированы молекулярными методами. Поэтому говорить о принадлежности всех перечисленных форм к одному и тому же виду следует с осторожностью.

На этой же странице представлено подробное описание морфологии церкарий, что, на мой взгляд, уместнее было бы сделать в соответствующей подглаве, посвященной результатам, а не в обсуждении.

На странице 86 обсуждается наличие мукоидных структур у церкарий *Brachycladioidea*, что показано автором работы впервые, что невозможно не отметить в качестве достоинства и новизны. Однако хотелось бы видеть функциональную интерпретацию этого результата, желательно в эволюционном аспекте.

В следующем абзаце обсуждаются собственные данные и результаты Чубрик (1966) по описанию личинок трематод «*Neophasis oculata*», которых автор диссертации в итоге относит к *Orthosplanchnus arcticus*, от двустворчатых моллюсков *Cerastoderma edule* и *Astarte crenata*. На мой взгляд, нет достаточных оснований для того, чтобы считать *N. oculata* от этих двустворчатых моллюсков представителем *O. arcticus*. Доступна ли информация о паразитофауне упомянутых видов двустворчатых моллюсков, например?

На странице 87 сказано, что «*Различия между двумя последовательностями не превышают уровень внутривидовой изменчивости, установленный для прочих видов*

брахикладиид (Приложение, Таблица 1).» При этом не указано, какой именно процент различий считается пороговым для разграничения видов *Brachycladiidae* по гену *nad3*? В тексте это нужно обязательно указать, иначе восприятие результата и его интерпретации затруднительны.

Рисунок 9. На мой взгляд, в названии нужно подчеркнуть, что это предполагаемая схема жизненного цикла, т.к. установлена все-таки по косвенным данным, хоть и довольно объемным.

Страница 89: «*Примечательно, что некоторые церкарии не покидают первого промежуточного хозяина, а инцистируются в гепатопанкреасе и гонаде гастроподы *C. affinis*, где становятся метацеркариями. Это позволяет *O. arcticus* факультативно сокращать пути своей циркуляции и реализовывать вторично диксенный вариант жизненного цикла, в котором гастропода *C. affinis* одновременно выступает в роли и первого, и второго промежуточного хозяина.*» Почему автор не рассматривает вариант, что трематоды и укороченным жизненным циклом могут принадлежать к другому виду? Это предположение, на мой взгляд, имеет право на существование и может быть изучено в будущем.

На этой же странице: «*Кольчатая нерпа питается, в основном, различными рыбами и ракообразными, однако двустворчатые моллюски также представлены в ее диете в качестве незначительного компонента (Holst et al., 2001; Labansen et al., 2007; Chambellant et al., 2013; Svetочева, Svetochев, 2015).*» Означает ли это, что *Brachycladiidae* могут циркулировать также через рыб и ракообразных?

На этой же странице: «*Примечательно, что зараженный *Brachycladiidae* gen. sp. 1 WS моллюск был выловлен недалеко от острова Большой Соловецкий, в окрестностях которого белухи регулярно собираются для производства на свет потомства (Krasnova et al., 2014). Это позволяет заключить, что именно белуха потенциально может выступать в качестве одного из окончательных хозяев *Brachycladiidae* gen. sp. 1 WS.*»

Предположение весьма скользкое. *Brachycladiidae* gen.sp. 1 - это редия, т.е. перед попаданием в окончательного хозяина должны развиваться церкарии, которые затем превращаются в метацеркарий в каком-то другом хозяине. Является ли этот другой гипотетический хозяин объектом для питания белух? Таким образом, даже для предположения такого уровня необходимы более весомые аргументы, подкрепленные фактическим материалом.

Страница 90, заключительный абзац: «*Таким образом, опираясь на совокупность косвенных свидетельств, мы предполагаем, что окончательным хозяином *Brachycladiidae* gen. sp. 1 WS, скорее всего, выступает белуха, и что вместе с видом "*Synthesium**

seymouri” они, вероятно, принадлежат роду *Odhnieriella*.» В начале абзаца речь шла о предполагаемой видовой принадлежности изучаемых редий. В итоге об этом ничего не сказано, предложена только родовая принадлежность.

Глава 4 «Жизненные циклы трематод из семейства Acanthocolpidae, строение их партенит и личинок» содержит результаты изучения морфологии и сравнительного молекулярного анализа представителей разных стадий жизненного цикла трематод Acanthocolpidae. Это наиболее содержательная глава, поскольку основанная часть исследованного материала относится именно к представителям этого семейства трематод. Получены обширные и интересные результаты, значительно меняющие представления о видовых различиях и особенностях жизненных циклов трематод *Neophasis. oculata* и *N. anarrhichae*. Выполнены подробные описания личинок и партенит указанных видов, включая данные для марит (приведены как минимум рисунки и фотографии), что не может не радовать. Выявлены некоторые особенности нуклеотидных последовательностей ДНК изучаемых видов, которые, тем не менее, требуют пристального анализа. В целом, по сравнению с другими главами, глава 4 написана не очень аккуратно, иногда сумбурно. Особенно это касается части с описанием результатов молекулярных исследований. Видимо большой объем данных, и небольшой период доступного времени не позволили выполнить детальную корректировку текста. Это исключительно общее впечатление в сравнении с другими главами диссертации, что, тем не менее, нисколько не умаляет восприятия изложенных результатов, как и их ценности. Остановлюсь подробнее на некоторых частях главы 4.

Страница 91: «Множество случаев заражения дочерними редиями акантокольпид было найдено в брюхоногом моллюске *Vissium undatum*...». Не очень удачная формулировка. Из этого предложения следует, что акантокольпиды заражаются редиями, а это совершенно нелогично.

Страница 92: «Единственное имевшееся различие между образцами было отмечено в позиции 99 (5.8S рДНК).» Этот результат необходимо проверить, поскольку ген 5.8S - это высоко консервативная последовательность ДНК. Изменчивость этого гена можно редко обнаружить между представителями разных подсемейств трематод, а между разными видами - практически исключено. Может быть, данная все-таки позиция относится к фрагменту ITS2? Либо имеет место нечетное прочтение последовательности.

Страницы 92-93: «Эти последовательности были получены для одного изолята марит каждого вида, *N. oculata* (1707 п.н.) и *N. anarrhichae* (1636 п.н.), и различались они между собой двумя нуклеотидными заменами». Здесь необходимо указать сайты и типы замен,

потому что, исходя из написанного, последовательности 18S рДНК двух разных видов уже отличаются по длине на 71 нуклеотид. Насколько данный результат объективен? Разница в длине обусловлена методологическими погрешностями или на самом деле имеет место быть?

Страница 93, начало предложения: «5' – *конец*...». Некорректно начинать предложение с цифры, нужно вводное слово с заглавной буквы, либо писать через «;» после предыдущего предложения.

На этой же странице автор сообщает об обнаружении у изолятов *N. anarrhichae* сдвига рамки считывания в последовательностях гена *cox1* мтДНК. Этот результат и его интерпретацию следует разобрать более подробно. Во-первых, о сдвиге рамки считывания можно судить только после анализа последовательности полноразмерного белок – кодирующего гена; судить об этом, анализируя небольшой фрагмент гена, категорически неприемлемо. Во-вторых, этот результат необходимо перепроверить, поскольку велика вероятность ошибки считывания последовательности, ошибки работы ДНК-полимеразы и т.п., факторов в данном случае может быть несколько. Ниже автор указывает, что «Используя другую пару праймеров, JB3/trem.cox1.rrn1, мы получили последовательности, длина которых у изолятов от обоих видов после обрезания составила 770 п.н. Эти сиквенсы не содержали стоп-кодона, транслировались в белок и были включены в итоговое выравнивание.» Сразу возникает вопрос, подтвердился ли сдвиг рамки считывания при использовании этой пары праймеров? Следует отметить, что сдвиг рамки считывания – это очень серьезное событие. Для того чтобы утверждать о наличии сдвига рамки считывания, нужны серьезные доказательства, как минимум повтор ПЦР и секвенирования, желательно с использованием высокоточной полимеразы.

Страница 94: «Семь нуклеотидных замен были синонимичными; функциональный эффект двух аминокислотных замен в позициях 217 (Ile→Thr) и 248 (Phe→Leu) был предсказан как нейтральный.» В предыдущем предложении сказано что выявлено 8 полиморфных сайтов. Далее, по этим сайтам обнаружено 7 синонимичных и 2 несинонимичные замены, что в сумме дает 9 замен. Либо где-то закралась ошибка или опечатка, либо по какому-то одному сайту выявлено более 1 замены, нужно указать, по какому и какие типы замен по данному сайту выявлены. Также не совсем ясно, каким образом предсказан нейтральный функциональный эффект?

Отдельного внимания заслуживает подпись к рисунку 10. 1) «Консенсусное дерево объединения соседей». На самом деле метод Neighbor-Joining в правильном переводе на русский язык читается как «метод связывания ближайшего»; данная формулировка наиболее полно отражает суть этого филогенетического алгоритма. Это заблуждение

встречается повсеместно, я при любой возможности стараюсь обращать на это внимание.

2) «*построенное с помощью метода генетической дистанции Тамура-Ней*». Дерево построено с помощью алгоритма NJ, о чем написано выше. Это уже предполагает, что в основе лежат генетические дистанции. Кроме того, Тамура и Ней разработали эволюционную модель, т.е. скорректированную формулу, на основании которой рассчитываются генетические дистанции. В данном случае нужно писать «Дерево построено с помощью алгоритма NJ с использованием эволюционной модели Тамуры-Нея».

П.глава 4.3. «Морфологические описания и данные о зараженности.» В целом, для этой подглавы актуальны основные достоинства и замечания, отмеченные и высказанные для п.гл. 3.4 относительно описаний. Кроме того, в подписи к рисунку 16 название вида цикла *Neophasis anarrhichae* не выделено курсивом.

На странице 106 приведены данные для марит *Neophasis anarrhichae*, но нет описания морфологии.

П.глава 4.5. «Филогенетическое положение *Neophasis* spp.» Основное замечание здесь относится к рисунку 19 – филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Байеса. Принципиально такое же дерево построено в главе 3, но там анализ основан только на последовательностях 28S рДНК, при этом статистические поддержки выше. Может быть, в данном случае тоже стоило ограничиться, или хотя бы дополнительно построить дерево только по 28S? Во-вторых, зачем дважды строить по сути одно и то же дерево, не совсем понятно.

На странице 112 п. главы 4.6. «Обсуждение» сказано, что «*Фрагмент 28S рДНК, содержащий домены D1–D3, не показал межвидовых различий между N. anarrhichae и N. oculata, что является практически беспрецедентной для трематод ситуацией.*» Здесь я бы не был столь категоричен, исходя из собственного опыта и результатов доступных обзорных публикаций (Cribb & Bray, 2011; Pérez-Ponce de León & Hernández Mena, 2019). Публикаций, в которых продемонстрирован подобный эффект, на сегодняшний день на самом деле немного, однако в настоящее время эффективность фрагмента 28S рДНК характерна не для всех групп трематод, а морфологические различия червей, наблюдаемые в совокупности с идентичными последовательностями 28S рДНК, видимо следует относить к адаптивным особенностям за неимением других доказательств видовых различий. Мы получали подобный результат для разных видов трематод рода *Orienthocreadium* например, а также для трематод рода *Srkabinolecithum* (Besprozvannykh et al., 2017), когда два вида, радикально различающиеся морфологически, отличались одной единственной нуклеотидной заменой по 28S рДНК, что откровенно не дотягивало

до межвидового уровня дифференциации. В общем, этот вопрос требует проведения отдельных масштабных исследований, однако называть выявленную особенность практически беспрецедентной для трематод я бы не стал.

На этой же странице: *«Фрагменты *cox1* мтДНК показали степень вариабельности, вполне соответствующую таковой у прочих изученных в этом отношении трематод. Разница между значениями внутри- и межвидовой генетической изменчивости вполне отчетливая,...»*. Неясно, что автор подразумевает под "вполне отчетливой разницей" относительно изменчивости фрагмента гена *cox1* мтДНК? Нужны более объективные характеристики, например, разница между внутри- и межвидовыми значениями находится в пределах стандартного отклонения или между этими значениями есть четкий хиатус? Тем более на фоне идентичных последовательностей 28S рДНК нельзя ожидать глубоких и четких видовых различий по фрагменту гена *cox1* мтДНК.

Глава 5 **«Обсуждение. Морфология личинок, жизненные циклы и эволюция трематод из таксона *Brachycladioidea*»** содержит краткое изложение основных полученных результатов и их подробнейшее обсуждение с предложением гипотетических сценариев эволюции жизненных циклов трематод *Brachycladioidea*. Содержание главы позволяет в полной мере оценить состояние проблем таксономии и эволюции *Brachycladioidea*, а также отражает способность автора к сравнительному анализу собственных и литературных данных, знанию основных эволюционных концепций для трематод в рамках темы диссертации и к выявлению причинно-следственных связей при обсуждении результатов и их интерпретации. В целом данная глава оставляет приятное впечатление после прочтения, критических замечаний к форме и содержанию этой главы нет.

Выводы в целом сформулированы грамотно и четко, в целом соответствуют поставленным задачам и позволяют увидеть целостную картину, отражающую результаты диссертационной работы.

Высказанные замечания, отмеченные недостатки и рекомендации сделаны главным образом с целью улучшения будущих научных исследований Георгия Артуровича и ни в коей мере не умаляют достоинств его диссертационной работы, ценности и актуальности полученных им результатов.

Представленная Кремневым Георгием Артуровичем диссертация «Жизненные циклы, филогения и эволюция трематод семейств *Acanthocolpidae* и *Brachycladiidae* (Digenea: *Brachycladiidae*)» полностью соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 "О порядке присуждения ученых степеней", а сам

диссертант заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.17. Паразитология.

Отзыв составил

Кандидат биологических наук, специальность 03.00.08 – «Зоология», 03.00.15 – «Генетика», ведущий научный сотрудник лаборатории паразитологии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН

Атопкин Дмитрий Матвеевич

690022, Приморский край, Советский район, проспект 100-летия Владивостоку 159/1

<https://www.biosoil.ru/>

Телефон: 8(914)705-28-05

E-mail: pan2006_82@mail.ru

Подпись Атопкина Д.М. подтверждаю

Учёный секретарь ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

Тюнин А.П.



Дата: 03.10.2024