

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Горина Владислава Анатольевича

на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему:

**«Филогения, систематика и историческая биогеография узкоротов
подсемейства *Microhylinae* (*Amphibia: Anura: Microhylidae*)»**

по специальности 1.5.12 – «зоология»

Актуальность темы диссертации В.А. Горина не вызывает сомнения. Работа посвящена изучению филогении, систематики и исторической биогеографии уникальных амфибий – подсемейству узкоротых лягушек *Microhylinae* семейства *Microhylidae*. Узкороты, насчитывающие более 100 видов, обитают в различных тропических регионах Южной, Юго-Восточной и Восточной Азии; отличаются высоким разнообразием структуры и размеров ареала, экологических и морфологических адаптаций, размеров тела (от 10 см до сверхминиатюрных около 1 см). Все это делает узкоротых лягушек чрезвычайно интересными как для углубленного изучения видового разнообразия и таксономии данного подсемейства, так и для понимания закономерностей формирования ареалов и видового разнообразия земноводных тропической Азии.

Несмотря на то, что часть родов подсемейства была описана еще в 19 веке, а в последние десятилетия появились публикации, посвященные изучению филогении и разнообразию *Microhylinae*, в том числе и с помощью молекулярно-генетических методов, в целом в области филогении, систематики и исторической биогеографии этой группы амфибий остается много нерешенных вопросов. Это относится и к другим биологическим особенностям узкоротов, в частности к морфологическим, экологическим и эволюционным основам возникновения миниатюризации. В диссертации В.А. Горина проведена комплексная исследовательская работа по поиску ответов на многие эти вопросы.

Диссертация В.А. Горина отличается высокой степенью **научной новизны**. Изучение обширного оригинального материала с привлечением новейших молекулярно-генетических, морфологических и статистических методов, позволило автору существенно расширить и во многом изменить имеющиеся представления о филогении, систематике, генетическом, морфологическом и таксономическом разнообразии лягушек подсемейства *Microhylinae*. Впервые на основании результатов анализа мтДНК и яДНК оригинального материала (102 из 116 номинальных видов подсемейства), предложена новая система подсемейства *Microhylinae*, включающая три трибы, девять родов и 116 видов, показана родовая самостоятельность двух линий рода *Microhyla* sensu lato и описан новый для науки род — *Nanohyla*.

Впервые на основании анализа 528 (из них 230 собственные) экземпляров из 153 локалитетов, охватывающих практически весь ареал семейства, были формально описаны восемь новых видов. В подсемействе *Microhylinae* установлено наличие существенного криптического разнообразия и выявлено до 30 новых форм потенциально видового статуса.

На основании построения оригинальной филогенетической схемы В.А. Гориним разработан новый палеобиогеографический сценарий, включающий базальную радиацию *Microhylinae* на три группировки в начале Палеоцена и дифференциацию на роды, начиная с позднего Эоцена. В эволюции всех групп *Microhylinae* установлена ключевая роль сухопутного моста между Индийским субконтинентом и Зондской Сушей, обеспечивавшего возможность фаунистического обмена. Для всех родов подсемейства *Microhylinae* представлены обновленные диагнозы по скелетным характеристикам, впервые аргументированно продемонстрирован параллельный характер эволюции размеров тела и соответствующих морфологических адаптаций у представителей подсемейства *Microhylinae*.

Результаты работы В.А. Горина имеют существенное **теоретическое** значение для инвентаризации биологического разнообразия и изучения

истории формирования герпетофауны Юго-Восточной Азии. Немаловажен вклад данного исследования для развития теории видообразования и микроэволюции амфибий. Описание новых видов, рода и криптических форм видового ранга в подсемействе *Microhylinae* расширяет знания в области систематики земноводных. Результаты изучения и моделирования эволюции размеров тела узкоротов и связанных с этим морфологических изменений скелета, вносят существенный вклад в представления о развитии конвергентных адаптаций, в том числе миниатюризации размеров тела амфибий.

Несомненна и **практическая** значимость работы. Полученные В.А. Гориним данные могут быть использованы в программах сохранения редких видов узкоротых лягушек. Результаты и методические разработки, включая статистическую обработку данных молекулярно-генетического и морфологического анализа, могут быть с успехом использованы в лекциях и практических занятиях по зоологии, герпетологии, филогенетике и биогеографии для студентов и аспирантов биологических ВУЗов. Новые нуклеотидные последовательности фрагментов ядерного и митохондриального генома, полученные автором для 230 образцов представителей подсемейства *Microhylinae* и отправленные в базу Genbank, в дальнейшем могут быть использованы другими исследователями данной группы земноводных.

Диссертация построена по классической схеме. Рукопись (217 страниц) включает введение, «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», выводы, благодарности, список литературы (118 источников, из них 117 на иностранных языках) и «Приложения». Основной текст иллюстрирован 11 таблицами и 37 рисунками. Приложения представлены на 69 страницах и содержат 9 таблиц и 11 рисунков.

По теме диссертации опубликовано девять статей, из них восемь в международных рецензируемых журналах, индексируемых в международных

базах данных Scopus и/или Web of Science, а также шесть тезисов отечественных и международных конференций.

Структура диссертации очень логичная.

Введение содержит все необходимые разделы. В нем приводятся данные об актуальности и степени разработанности темы исследования, об объекте и предмете исследования, научной новизне, теоретической и практической значимости и методах исследования. Также в этой части диссертации четко формулируются цель и задачи работы, основные положения, выносимые на защиту.

Степень достоверности полученных соискателем результатов обосновывается большим объемом оригинальных и сравнительных данных, детальным описанием методов молекулярно-генетического и филогенетического анализа, гарантирующих их воспроизводимость, а также публикациями автора в высокорейтинговых журналах. Приготовленные скелеты узкоротов депонированы в коллекции Зоомузея МГУ, данные компьютерной томографии размещены в базе Morphosource, полученные сиквенсы в базе Genbank.

Описание личного вклада автора подтверждает ключевую роль В.А. Горина в работе над диссертацией и публикациями.

Обзор литературы включает семь разделов, в которых рассматриваются публикации, посвященные общей характеристике узкоротов семейства Microhylidae, молекулярно-генетическим исследованиям этого семейства, филогенетическим связям подсемейства Microhylinae, исторической биогеографии герпетофауны Юго-Восточной Азии, исторической биогеографии лягушек подсемейства Microhylinae, особенностям скелетного устройства лягушек подсемейства Microhylinae и вопросам миниатюризации Anura. Обзор литературы отражает широкую

эрудицию автора в проблемах, имеющих отношение к теме диссертации. Отдавая должное результатам, полученным другими авторами, В.А. Горин выявляет до сих пор неясные вопросы, решению которых посвящено его исследование.

Описание **материалов и методов** включает восемь разделов. Автором проанализирован огромный материал – 230 экз. лягушек подсемейства *Microhylinae*, включающих образцы, собранные автором и его коллегами в разных частях ареала узкоротов, а также из коллекций кафедры зоологии позвоночных биологического факультета МГУ и музеев. Работа носит комплексный характер. Подробно описаны методы молекулярно-генетического и филогенетического анализа. Автор использовал собственные данные по фрагментам генов малой (12S рРНК) и большой (16S рРНК) субъединиц рибосомальной РНК, транспортной РНК валина (тРНК^{Val}), а также ядерного гена нейротрофического фактора мозга (BDNF). Кроме того, для филогенетического анализа привлекались данные из Генбанка и из работ зарубежных исследователей. В общей сложности проанализированы молекулярные данные от 528 экземпляров представителей 102 признанных на сегодняшний день видов *Microhylinae* практически со всего ареала подсемейства. Чрезвычайно важны разделы 4 и 5, в которых приводятся использованные автором для описания видового разнообразия и истории формирования фауны узкоротов алгоритмы автоматического разделения видов и программы анализа времен дивергенции. Следует отдельно отметить раздел, посвященный методам биогеографического анализа и реконструкции предковых ареалов современных групп *Microhylinae*. Он включает моделирование географических областей возникновения предка современных групп узкоротов при помощи алгоритмов из программы RASP 4.0, деления современного ареала *Microhylinae* на девять регионов согласно традиционным представлениям о биогеографических барьерах для герпетофауны Южной, Юго-Восточной и Восточной Азии. Два последних раздела главы посвящены

морфологическому анализу узкородов (72 вида всех 10 родов *Microhyalinae*) и соответствующей статистической обработке данных, включая реконструкцию изменения размеров тела в ходе эволюции и визуализацию остеологических данных. Для получения результатов автором выполнена очень большая и кропотливая работа с использованием моделирования эволюции размеров тела в пространстве R, визуализации остеологических образцов методом бескислотного дифференцирующего окрашивания, компьютерной микротомографии, построения 3D-моделей и др.

Методический раздел диссертации дает представление об огромной работе, выполненной В.А. Гориним для достижения поставленной цели. Все стадии лабораторных исследований, богатый арсенал использованных современных методов и программ описаны четко и прозрачно, свидетельствуя о высоком профессиональном уровне автора. Отмечу, что в ходе проведения исследования В.А. Горин широко использовал лабораторные и технические возможности разных факультетов МГУ.

В следующей части диссертации, состоящей из шести разделов, подробно описаны **результаты исследования**. В первом приводятся результаты изучения филогенетических связей подсемейства *Microhyalinae*. Автор установил монофилетичность подсемейства *Microhyalinae* и описал составляющие его три клады. Хотя в целом эти результаты согласуются с предварительными схемами, предложенными другими авторами, анализ данных, существенно превышающих объем, исследованный ранее, позволил В.А. Горину впервые аргументировано доказать данную филогенетическую структуру *Microhyalinae*. Далее в этом разделе последовательно рассматривается структура каждой из трех выделенных клад с описанием родов и видов. Например, для большой клады *Microhyala-Nanohyala-Glyphoglossus* автор установил, что все виды данных родов группируются в девять хорошо поддерживаемых субклад. Описание родов и видов каждой клады приводятся с указанием их распространения, что важно для

дальнейшего биогеографического анализа. Во втором разделе дается оценка видового разнообразия подсемейства *Microhylinae*, полученная на основании анализа филогенетических схем. Для оценки числа линий, имеющих потенциально видовой статус, автор использовал четыре альтернативных подхода к разграничению видов с помощью четырех различных программ (ABGD, bGMYC, PTP и bPTP). Все типы анализа однозначно указывают на значительную недооценку видового разнообразия в подсемействе *Microhylinae*: для 102 признанных видов, включенных в филогению, число восстановленных видов в зависимости от типа использованной программы составило от 116 до 132. Для 19 известных в настоящее время видов узкоротов В.А. Горину удалось выявить наличие от двух до семи криптических форм видового ранга в каждом. В третьем разделе приводятся оценки времен дивергенций основных кладогенетических событий в истории *Microhylinae*, времени существования последних общих предков (MRCA) и периодов диверсификации описанных систематических группировок внутри подсемейства. В четвертом, очень интересном разделе представлены результаты биогеографического анализа и моделирование предковых ареалов различных групп подсемейства *Microhylinae*. Полученные результаты отлично иллюстрируют рисунки 14 (с. 66) и 15 (с. 68). В пятом разделе приводятся полученные данные по эволюции размеров тела лягушек подсемейства *Microhylinae*. В шестом дается описание разнообразия скелетных признаков в подсемействе *Microhylinae*, связанных с миниатюризацией. Все результаты отлично иллюстрированы. Отличное впечатление производят фотографии остеологического материала в этой части диссертации и в приложении.

Обсуждение включает четыре больших раздела, посвященных филогении, систематике, исторической биогеографии и миниатюризации узкоротых лягушек, а также общее заключение. Мне очень понравился стиль изложения всех разделов этой важной части диссертации. Собственные результаты автор рассматривает в сравнении с результатами и гипотезами

других исследователей. Автор обсуждает представленную обновленную филогению подсемейства Microhylinae, для разрешения ряда неясных моментов дополнительно используя методы определения границ видов. Например, что род *Chaperina*, ранее выделявшийся в отдельное подсемейство, по данным автора входит в состав Microhylinae в качестве ближайшего родственника одной из больших клад. Говоря о результатах анализа разграничения видов, в результате которого от 14 до 30 линий предположительно имеют видовой статус, В.А. Горин справедливо отмечает, что из-за возможного перекрывания внутривидовой и межвидовой дифференциации определение видов у этих лягушек только на основе генетических данных недостаточно, следует применять интегративный подход, включающий различные видовые характеристики. Это свидетельствует о высоком профессионализме автора.

В этой части диссертации представлены восемь новых видов и один род узкоротов, описанных в данной работе. В то же время сходство генетических, морфологических и других характеристик позволили В.А. Горину с соавторами один из родов (*Metaphrynella*) рассматривать в качестве младшего синонима рода *Phrynella*. Также представлена предлагаемая обобщенная система Microhylinae. Отмечу, что большое внимание автор уделяет морфологии и экологии исследованных видов. Обсуждая результаты по исторической биогеографии Microhylinae автор вполне аргументированно утверждает, что узкороты представляют собой идеальную группу для палеобиогеографических реконструкций фаунистических процессов Юго-Восточной Азии. Очень интересный раздел обсуждения посвящен миниатюризации узкоротов. Автору удалось установить многократные события миниатюризации в группировке Microhyla-Nanohyla-Glyphoglossus, показать, что повторные случаи миниатюризации позволяют понять взаимосвязь определенных морфологических особенностей с крайним уменьшением размеров тела.

Заключение в сжатой форме представляет основные результаты работы.

В целом часть диссертации, посвященная обсуждению результатов, свидетельствует о зрелости В.А. Горина как ученого-исследователя, что проявляется не только в тщательной проверке различных теорий и гипотез большим арсеналом методов, но и в очень взвешенной интерпретации результатов.

Отдельно отмечу очень объемное и информативное приложение к основному тексту рукописи диссертации.

Диссертация мне очень понравилась. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы результатами работы и их обсуждением. Автореферат включает все основные результаты и выводы работы и полностью соответствует тексту диссертации. Диссертация написана хорошим литературным языком, отлично иллюстрирована. Все основные результаты диссертации опубликованы в научных журналах и представлены на международных конференциях.

Из замечаний, пожеланий и вопросов перечислю следующее:

1. Чем был обусловлен выбор использования в филогенетическом анализе ядерного гена BDNF (нейротрофического фактора мозга)? Какова функция этого гена?
2. В подписях к рисункам филогенетических отношений следовало бы указать, какие гены включены в анализ и какова общая длина анализируемого участка ДНК в каждом отдельном случае.
3. В подписях к рисункам 11(с. 55), 12 (с. 59), 13 (с. 61) написано «Узлы с тенденцией к поддержке обозначены белыми кружками», но на деревьях их не видно.
4. При построении филогений широко используются данные из базы Genbank. Возникает вопрос: не встречались ли автору ошибки в видовой идентификации образцов лягушек при анализе этих данных?

5. Не пробовал ли автор при описании новых видов проверить их обособленность с помощью анализа гена CO1 мтДНК («баркодингового» маркера), часто используемого для видовой идентификации?
6. В списке литературы отсутствует цитируемая работа Nguyen et al., 2019.
7. Не очень удачное выражение «датасет», это выборка?

Вместе с тем, высказанные замечания не являются принципиальными и не умаляют исключительно высокого качества диссертационного исследования.

В целом диссертационная работа В.А. Горина является завершенным научным исследованием, имеющим существенное теоретическое и практическое значение. По объему выполненных исследований, разнообразию использованных методов, качеству обработки данных и обсуждения полученных результатов работа В.А. Горина существенно превышает уровень хорошей кандидатской диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация В.А. Горина «Филогения, систематика и историческая биогеография узкоротов подсемейства Microhylinae (Amphibia: Anura: Microhylidae)» отвечает всем требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.12 – «зоология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационная работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель, **Владислав Анатольевич Горин**, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – «зоология».

Официальный оппонент: доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель кабинета методов молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук»
ИПЭЭ РАН

Холодова Марина Владимировна

07 ноября 2022 г. /

Контактные данные:

тел.: +7 _____ e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.02.04 – зоология

Адрес места работы: 119071, (Россия) г. Москва, Ленинский проспект, д. 33,
ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова
Российской академии наук» ИПЭЭ РАН

Тел.: 8 (495) 952 77 97; e-mail: noo.ipee@gmail.com

Подпись М.В. Холодовой удостоверяю

Ученый секретарь ИПЭЭ РАН

д.б.н. Н.Ю. Феокистова

07 ноября 2022 г.