

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Масальковой Натальи Александровны на тему «**Исследование молекулярной филогении мидий (*Bivalvia*, *Mytilidae*) дальневосточных морей России и особенностей дивергенции, генетической и морфологической изменчивости видов комплекса *Mytilus* ex. group *edulis***», представленную в диссертационный совет на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа Масальковой Натальи Александровны посвящена проблеме систематики в семействе морских моллюсков *Mytilidae* (*Mollusca*, *Bivalvia*), о которой до сих пор нет окончательного мнения. Частным случаем этого вопроса является уточнение таксономического статуса двух морфологически сходных видов, входящих в группу *Mytilus* ex. group *edulis*, которые к тому же обладают способностью к гибридизации. Важность изучения митилид не вызывает сомнения, поскольку представители этого семейства являются объектами промысла и марикультуры, биологическими маркерами загрязнения водной среды, а также объектами фундаментальных исследований, направленных на изучение процессов эволюции и видообразования.

Работа изложена на 118 страницах, иллюстрирована 13 рисунками и содержит 7 таблиц. Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из введения, четырех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение), выводов и списка литературы, включающего 154 наименования, из них 46 на русском и 108 на иностранном языке. Помимо этого, в работе представлено 4 приложения, состоящие из таблиц. Есть небольшие замечания к оформлению диссертации, но все они несущественные, за исключением больших пробелов в главе «результаты и обсуждение» за счет некорректной вставки таблиц и рисунков в текст, которая повлекла за собой наличие не менее 8 полупустых страниц в диссертации.

Во Введении описана проблема и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи работы, определена научная новизна, теоретическое и практическое значение работы, а также положения, выносимые на защиту. Цель диссертационной работы – исследовать внутривидовую и межвидовую изменчивости и дивергенцию мидий, преимущественно подсемейства *Mytilinae*, на основе генетико-биохимических и молекулярных маркеров генов, а также с использованием морфологических признаков, и приложение полученных данных в эволюционную генетику и систематику таксона. Согласно цели были поставлены задачи исследования.

Глава 1 посвящена обзору литературы. **В подразделе 1.1.1** раздела «**Характеристика объекта исследования**» представлена современная таксономия семейства *Mytilidae*. Необходимо отметить, что более половины объема подраздела составляет информация, скопированная из автореферата диссертации Чичвархина А.Ю. (2005 г.), с небольшими дополнениями (С. 15-16; здесь и далее страницы диссертации), однако этот фрагмент не оформлен в виде цитаты. На данный момент существуют более современные работы (Samadi et al., 2007; Morton, 2015; Liu et al., 2018), которые можно рассмотреть, дополнив те данные, которые были известны на момент защиты работы Антона Юрьевича.

В подразделе 1.1.2 обсуждаются вопросы таксономического статуса видов *Mytilus* ex. group *edulis*. Приводятся данные о разных методах, позволяющих отличить морфологические виды. Возможно, стоило более подробно остановиться на преимуществах каждого из этих

методов. Также не хватает обсуждения других методов исследования для указанной группы моллюсков, например, анализа структуры хромосом видов *Mytilus* (Pérez-García et al., 2014).

Подраздел 1.1.3 связан с описанием морфологических и биологических особенностей видов семейства Mytilidae. Логичнее было поменять местами этот и предыдущий подразделы. Только полстраницы написано автором лично, остальная часть раздела является оформленной цитатой из работы Зенкевич (1968; на самом деле, автором является Брэм) (С. 19-22). Работа с литературными источниками подразумевает использование более чем одной ссылки и поиск альтернативных источников и мнений по вопросу. Тем более, большая часть информации, которая присутствует в цитате, избыточна.

Подраздел 1.1.3.1 включает описание морфологических и биологических особенностей рода *Mytilus* и, в частности, видов *M. galloprovincialis* и *M. trossulus*. Для обоих представителей рода можно было добавить сведения о распространении в мире и, в частности, на территории Дальневосточных морей России.

В разделе 1.2 рассмотрена физико-химическая характеристика района исследования, и вновь большая часть раздела (С. 27-29) состоит из цитаты работы Ростова с соавторами (2005). Практически вся информация из этой цитаты никак не используется автором в обсуждении для подтверждения или опровержения выдвинутых гипотез, поэтому непонятно появление двух страниц, повествующих о скорости течения, глубинах и солености. Единственное, что, возможно, важно в данной цитате, – это температура воды, которая оказывает влияние на физиологические процессы моллюсков, как указано в подразделе 1.1.3.1.

Раздел 1.3 содержит краткий обзор методов, используемых в работе: генетико-биохимический (подраздел 1.3.1) и молекулярно-филогенетические, применяемые для анализа (подраздел 1.3.2). Не хватает информации о ДНК-маркерах (ген *Me-5* и участок ITS1-5.8S-ITS2 рДНК), которые также используются в диссертации. Помимо этого, можно было привести в качестве примеров публикации, в которых использовались обсуждаемые аллозимные и ДНК-маркеры, чтобы показать эффективность их работы.

В главе 2 автор дает описание материалов и методов, которые объединены в непронумерованные подразделы. **Подраздел «Филогенетический анализ»** начинается с таблицы 2.1, которая занимает 8 страниц. Во-первых, эту таблицу можно было сократить вдвое, уменьшив высоту строк и междустрочные интервалы. Во-вторых, этот массив данных неинформативен, потому что виды представлены хаотично, не указаны семейства, к которым они принадлежат, а также какие генетические маркеры соответствуют тому или иному образцу или номеру из базы данных NCBI. Единственное, о чем можно получить представление – это место и дата сбора образца, однако эти данные автор не анализирует в работе. Далее представлена информация о стандартных методах получения и анализа генетических данных, при изучении которых возникло только два вопроса: 1) почему при использовании Байесовского подхода было использовано именно 1 млн генераций? 2) на каком основании в качестве внешней группы были использованы представители семейства Sertiferidae? **Подраздел «Исследование гибридной зоны двух видов мидий»** содержит информацию о количестве образцов, которая отличается от той, которая представлена в публикациях автора диссертации (в частности, Масалькова и др, 2016; Kartavtsev et al., 2018). Также не прописан метод сбора малакологического материала, который при довольно ограниченном количестве образцов из каждого отдельного локалитета может оказать существенное влияние на репрезентативность выборки. Рисунок 2.1 содержит гораздо меньше данных о местах сбора материала, чем в опубликованных автором статьях, поэтому менее

информативен. Для Таблицы 2.2 с перечислением морфологических признаков не хватает схемы, на которой отмечены все эти признаки, и которая присутствует в статье Масальковой и др. (2016). **В подразделе «Анализ аллозимных локусов»**, как и в последующем не хватает информации о количестве проанализированных образцов; указано, что работа проводилась по 6-8 локусами, хотя для некоторых наборов данных количество локусов было уменьшено автором до четырех. В этом подразделе, как и во всех публикациях автора используется фраза «для краткости часть параметров здесь не названа», но если для статьи это уместно вследствие ограниченного объема, то отсутствие этих данных в диссертации ограничивает адекватное восприятие информации, поскольку в разделе «результаты и обсуждение» возникают неожиданные критерии и показатели, которые не были упомянуты в материалах и методах. В последнем абзаце подраздела указан диапазон значений, на основании которых выделяются группы родительских видов и их гибридов. Автор забыла упомянуть, что для разного набора данных они выбирали разные диапазоны значений. Эта информация, но не её обоснование, присутствует в трех публикациях диссертанта (Картавец и др., 2014; Масалькова и др., 2016; Kartavtsev et al., 2018). **В последнем подразделе «Анализ ДНК-маркеров»** приводится информация об амплификации двух разных последовательностей ядерного генома: ген прикрепительного белка нитей биссуса ME-5 и участке ITS1-5.8S-ITS2 рДНК, который автор для краткости обозначил ITS-1,2. При этом для второго маркера отсутствует информация о дальнейших манипуляциях с полученным после амплификации фрагментом, хотя согласно данным статьи автора (Kartatsev et al., 2018) также использовалась эндонуклеаза *HhaI* согласно методике Heath et al. (1995), за счет которой и получались разные по длине фрагменты. Помимо этого, нужно с осторожностью использовать термин «аллель» в отношении изменчивости, обнаруженной для этого маркера. Аллели - различные формы одного и того же гена, расположенные в одинаковых участках (локусах) гомологичных хромосом. Несмотря на то, что участок ITS1-5.8S-ITS2 содержит ген 5.8S рРНК, фактически это большая часть этого региона – некодирующая область, то есть не ген. Этот участок входит в состав рибосомального кластера, который представляет многочисленные тандемные повторы, располагающиеся в одном или нескольких (реже) участках хромосом. Повторы этого кластера обычно гомогенны внутри вида (Bower et al., 2008). Более того, рибосомальные участки у видов *M. galloprovincialis* и *M. trossulus* находятся в разных хромосомах или разных частях гомологичных хромосом (Pérez-García et al. 2014), то есть не могут считаться аллелями хотя бы по этому признаку и эволюционируют независимо. К сожалению, я могу только предположить, что гибриды содержат хромосомный набор обоих родителей, поскольку информация об этом мне неизвестна. Таким образом, фактически автор изучила внутригеномный полиморфизм. Что касается гена ME-5, то он также входит в семейство близкородственных белков (Inoue et al., 1995), которые также для указанных видов могут находиться на разных хромосомах, поэтому необходимо с осторожностью использовать термин «аллель» и в отношении данного маркера.

В главе 3 излагаются результаты и их обсуждение. **В подразделе 3.1** обсуждаются филогенетические отношения в семействе Mytilidae с использованием трех ядерных маркеров (генов 28S и 18S рРНК, а также гистона *H3*). Данные опубликованы автором в статье Картавец и др. (2018), однако в диссертации не приводятся значения генетических дистанций, которые есть в указанной публикации. К этому разделу есть ряд замечаний: (1) зачем обсуждается семейство Sertifiridae, представители которой являются внешней группой? (2) почему в обсуждении обходятся стороной некоторые кластеры, например, на дереве 18S рРНК кластер, включающий некоторые виды из родов *Mytilus*, *Septifer*, *Mytilaster* и *Hormotoma*? (3) О какой подтвержденной монофилии семейства Mytilidae может идти речь,

если из всех деревьев поддержка есть только на реконструкции ВА? Также сомнительна монофилия подсемейства *Mutillinae* на дереве *18S* рРНК, поскольку представители рода включены в совершенно разные кластеры? (4) Почему использованы такие короткие фрагменты генов, которые, по-видимому, были ограничена данными, полученными в настоящем исследовании, поскольку, например, в публикации Liu et al. (2018) для анализа использованы гораздо большая длина последовательностей, включая данные из базы данных NCBI? Помимо этого, хотелось бы увидеть в обсуждении сравнительный анализ данных автора и Liu et al. (2018), которые использовали в своей работе нуклеотидные последовательности генов *COI*, *16S* рРНК, *18S* рРНК, *28S* рРНК и *H3*.

В подразделе 3.2.1 анализируется гибридная зона *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в северо-западных акваториях Японского моря на основе выборок 2011 года. Данные опубликованы автором в статье Картавцев и др. (2014) и частично в Kartavtsev et al. (2018). Использовано 8 аллозимных локусов, а также данные для ДНК маркеров *Me-5* и *ITS-1,2* для 6 выборок. Автор пишет, что «на основе визуального анализа генотипической идентификации исследованных мидий можно говорить о хорошей воспроизводимости данных по всем трем группам маркеров», однако данные на рисунке 3.5 с гистограммами распределения частот и в таблице 3.2 ставят под сомнение это утверждение. Так, например, для выборки из б. Гайдамак по данным аллозимного анализа количество гибридов составляет $23 \pm 2\%$, тогда как согласно ДНК-маркерам это значение – $5 \pm 1\%$; для трех других выборок по первому набору аллозимных локусов обнаружено от 7 ± 1 до $16 \pm 2\%$ гибридов, тогда как ДНК-маркеры не выявили наличие гибридов в этих выборках. Автор оперирует средними показателями, которые, действительно, на первый взгляд, не так сильно отличаются для аборигенного вида *M. trossulus* ($80 \pm 7\%$ аллозимы, $87 \pm 7\%$ *Me-5*). Тем не менее, для реже встречающихся гибридов значения фактически отличаются в 2 раза ($12 \pm 3\%$ и $6 \pm 3\%$ для аллозимных и ДНК-маркера соответственно). Хотя автор считает, что эти значения для аллозимных маркеров дают всего лишь «несколько завышенную долю гибридов». Также примечательно, что согласно публикации автора Kartavtsev et al. (2018) данные для выборки 2011го по *Me-5* маркеру отсутствовали, тогда как в таблице 3.2 указаны значения, равные другому ДНК-маркеру. Тем не менее, автор получил новые данные для видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis* из северо-западной части Японского моря и сравнил с ранее опубликованными. Автор указывает, что обнаружена зона инвазии на севере (б. Киевка), и эту информацию потом выносит в выводы диссертации в части «граница ареала *M. galloprovincialis* пролегает севернее районов, документированных ранее в генетических исследованиях», и при этом ниже в обсуждении пишет, что «гидробиологические находки этого вида с севера Приморья известны» и ссылается на Лутаенко, Колпаков (2016), которые обнаружили в 2012 г. поселения интродуцента гораздо севернее (зал. Ольга), тогда как в б. Киевка авторы этой публикации допускают случайный занос вида на основании проанализированного материала. Автору диссертации нужно быть осторожнее с формулировкой выводов, поскольку отсутствие генетического подтверждения наличия *M. galloprovincialis* в более северных регионах просто означает, что генетический анализ до сих пор не был проведен для этой выборки, о чем автор пишет в обсуждении в отношении других точек сбора. Автор также отмечает, что «гибридизация между аборигенным видом и интродуцентом до определенной степени ограничена какими-то изоляционными механизмами». Однако предположения о природе этих механизмов в диссертации отсутствует. Предлагаю диссертанту ознакомиться с работой Pérez-García et al. (2014), в которой помимо указанных выше отличий на хромосомном уровне для видов *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, есть ссылки на другие работы, где показано, что виды *M. edulis* и *M. galloprovincialis* начали расходиться примерно 2 млн лет назад, тогда как виды

M. trossulus дивергировал от общего с указанными выше видами предка 3.5 млн лет назад. Эти эволюционные отношения отражаются в сходстве и различиях хромосом всех трех указанных видов группы *Mytilus* ex. group *edulis*.

В подразделе 3.2.2 анализируется гибридная зона *M. trossulus* – *M. galloprovincialis* в северо-западных акваториях Японского моря на основе выборок 2012-2013 гг. Результаты опубликованы автором в статьях Масальковой и др. (2014) и частично в Kartavtsev et al. (2018). В разном наборе данных используется 4-6 аллозимных локуса для 5-6 выборок. Помимо этого, анализируются данные по гену *Me-5* и набор из 11 морфологических признаков и 10 критериев. Согласно данным статьи автора (Kartavtsev et al., 2018) данные по ДНК-маркеру отсутствуют для выборки из б. Преображенье, однако в тексте диссертации эта информация опущена. Представление результатов немного неструктурировано, что усложняет восприятие информации. Часть информации дублирует предыдущий подраздел. Некоторые моменты в данном подразделе вызывают вопросы: (1) Автор указывает, что «Полученные результаты в целом соответствуют данным предыдущих исследований и оценкам на основе ДНК-маркера *Me-5*», однако анализируемые до этого абзаца данные по аллозимным маркерам дают прямо противоположный результат для выборок из б. Киевка и пос. Зарубино (см. таблицу 3.3). Это несоответствие данных для выборки 2012-2013 гг. отмечаются в одной из публикаций автора (Kartavtsev et al., 2018) (2) Рисунок 3.9 в диссертации менее информативен, чем аналогичный рисунок в статье Масальковой и др. (2016). (3) Также вызывает сомнения интерпретация результатов по морфологическим признакам и индексам. Автор пишет, что в анализе «преобладает и доля индексов, имеющих нормальное распределение или близкое к нему распределение», такое же утверждение сделано и для самих признаков. Однако несмотря на то, что график (отсутствует в диссертации), приведенный в статье Масальковой и др. (2016) для одного из признаков (LIG_LN) действительно согласуется с утверждением автора, значения коэффициентов асимметрии и эксцесса, приведенные в таблице 3.4, говорят об отсутствии нормального распределения для большинства других признаков. Автор в главе «материалы и методы» ссылается на работу Лакина (1980), в которой отмечено, что при размере выборки в диссертации ($n = 330$), критические значения для коэффициентов асимметрии и эксцесса при указанном авторами доверительном интервале составляют 0.230 и 0.818 соответственно (2.0 при отрицательном значении для второго параметра). Исходя из этого, вариационные ряды только одного из используемых морфологических параметров (LIG_LN) и двух индексов (IND3 и IND6) имеют нормальное распределение.

В последнем подразделе 3.2.3 главы комбинируются данные, полученные за весь период исследований, а также приводится сводный анализ, отсутствующий в предыдущих двух разделах. Результаты опубликованы автором в статье Kartavtsev et al. (2018). Большая часть данных вынесена в виде таблиц в приложения I-IV. В данном подразделе присутствует несоответствие ссылок на рисунки и таблицы тем данным, которые указаны в тексте (рисунок 3.12 на С. 86; рисунок 3.6 на С. 92, приложение III на С. 92), а также представленный материал скомбинирован местами нелогично. Например, популяционно-генетический анализ в работе показал, что дефицит гетерозигот наблюдается в выборках за 2011 и 2012-2013 гг., и автор предполагает, что это является «индикатором наличия внутривидовой подразделенности» (С. 84). Однако обсуждение причин возникновения этого дефицита начинается только на С. 89. Также в разделе появляются параграфы (формулировка автора диссертации) «совместный генетический и морфометрический анализ» и «объединенный генетический и морфометрический анализ», между которыми внедряется параграф «популяционно-генетический анализ», а в последнем имеется ссылка на «заявленный в предыдущем

параграфе вывод», который, на самом деле, сделан в параграфе, находящемся до параграфа «совместный генетический и морфометрический анализ». Вследствие описанных недочетов, поиск логических цепочек в рассуждениях автора занимает дополнительное время. Также путается и сам автор, дублируя информацию на С. 88 и 92. Помимо этого, есть и другие моменты, которые вводят в заблуждение, например: (1) Автор также указывает, что «местный вид *M. trossulus* доминирует в выборках», однако приведенная частота ниже частота генотипов по четырем аллозимным маркерам для выборки 2012-2013 гг. ($45\pm 2\%$) говорит о противоположном заключении в отношении этого параметра. Однако далее автор отмечает, что «уменьшение числа аллозимных маркеров в 2012 – 2013 годах негативно сказалось на результатах», но приводит в качестве доказательства данные за 2011 г. (рисунок 3.10), который к тому же дублирует рисунок 3.5а. (2) В анализе морфологических данных автор указывает LP_L и LPK_L, как индексы, на дискриминирующие виды *M. trossulus* и *M. galloprovincialis*, ссылаясь на публикацию Kartavtsev et al. (2005). Чуть позже автор, снова ссылаясь на ту же работу, написала, что «LP, ни LP_L при более точном исследовании такими не оказались», и говорит о том, что результаты представленные в работе подтверждают эти выводы. Однако далее просто дается ссылка два рисунка и таблицу в Приложении, без обсуждения. Более того, этот признак отмечен в диссертации как «PERL_L», о чем узнать можно только из статьи Kartavtsev et al. (2018).

Глава «**Заключение**» резюмирует полученные автором результаты.

Исходя из вышесказанного, формулировка некоторых выводов или их частей вызывает сомнения:

- часть вывода №1 «установлена монофилия семейства Mytilidae и подсемейства Mytilinae. Опровергнута полифилитичность подсемейства Mytilinae» не может быть верной при отсутствии поддержек в узлах деревьев, полученных с использованием всех маркеров, а также при наличии представителей Mytilinae в разных кладах дерева 18S рРНК;

- вывод №3 – это только предположения автора, которые не имеют подтверждения;

- часть вывода №4 «Обнаружено, что граница ареала *M. galloprovincialis* пролегает севернее районов, документированных ранее в генетических исследованиях, в б. Киевка» означает только, что в более северных частях ареала (зал. Ольга) генетические исследования не проводились, но самовоспроизводящаяся популяция этого вида, как указано выше, в этом районе была зарегистрирована ещё в 2012 г. (Лутаенко, Колпаков, 2016);

- оставшаяся часть вывода №4 может быть объединена с выводом 2;

- вывод №6 впервые был сделан в работе Kartavtsev et al. (2005), несмотря на то, что авторы этой публикации отметили, что требуется больше исследований для этого признака. Тем более, смущает вариант формулировки этого вывода в положении, выносимом на защиту.

В целом, оценивая диссертацию Масальковой Натальи Александровны, следует отметить наличие большого объема новых данных, а также умение автора анализировать и обсуждать материал. Сделанные замечания носят дискуссионный характер.

Автореферат отражает содержание диссертации. Как отмечено выше, результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также в тезисах научных конференций различного уровня.

Таким образом, диссертационная работа «Исследование молекулярной филогении мидий (*Bivalvia*, *Mytilidae*) дальневосточных морей России и особенностей дивергенции, генетической и морфологической изменчивости видов комплекса *Mytilus* ex. group *edulis*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по актуальности, объему проанализированного материала и приоритетности полученных результатов соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а её автор, Масалькова Наталья Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Татонова Юлия Викторовна

Татонове Юлия Викторовна

Кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии

690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159, ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

e-mail: ytatonova@gmail.com

29.04.2020 г.

Российская Федерация

Город Владивосток Приморского края

Двадцать девятого апреля две тысячи двадцатого года

Я, Польская Марина Андреевна, нотариус Владивостокского нотариального округа Приморского края, свидетельствую подлинность подписи Татоновой Юлии Викторовны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 25/6-н/25-2020-2-196.

Взыскано государственной пошлины (по тарифу): 100 руб. 00 коп.

Уплачено за оказание услуг правового и технического характера: 1380 руб. 00 коп.



М.А.Польская
М.А.Польская