

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
на диссертацию  
**СИДОРОВОЙ ТУЯНЫ ВАЛЕРЬЕВНЫ**  
**«МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭВОЛЮЦИИ**  
**БАЙКАЛЬСКИХ СИГОВЫХ РЫБ»,**  
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.7. Генетика

Семейство Coregonidae является одной из самых разнообразных групп лососевых с высоким уровнем морфологического и экологического разнообразия. Несмотря на это, многие виды изучены только с использованием морфологических признаков, высокая вариабельность которых затрудняет идентификацию подвидов и форм. Особый интерес представляют случаи симпатрического видообразования. Озеро Байкал является одним из древнейших реликтовых озер с высоким уровнем биоразнообразия. Условия в озере способствуют появлению большого количества различных экологических форм, что дает возможность изучения как микроэволюционных процессов, так и процессов видообразования.

Диссертационная работа Сидоровой Т.В. посвящена изучению эволюции байкальских сиговых рыб с использованием современных молекулярно-генетических методов. Текст диссертации изложен на 138 стр., включает 11 таблиц, 13 рисунков, список литературы на 29 стр. (265 наименований, из которых 187 иностранных), списка сокращений на 2 стр., также в работу включены 3 Приложения на 79 стр. Диссертация состоит из «Введения», 4 основных глав («Литературный обзор», «Материалы и Методы», «Результаты» и «Обсуждение»), «Заключения» и «Выводов». Структура диссертации стандартная и общепринятая.

Название работы имеет очень обобщенный характер, что не совсем отражает содержание работы. В части «Филогенетический анализ», действительно, дается анализ эволюционных взаимоотношений сигов оз. Байкал с другими представителями семейства Coregonidae на всем протяжении ареала. Микросателлитный анализ больше соответствует популяционному анализу, транскриптомный и микробиомный анализы вообще концентрируются всего лишь на 2 представителях, байкальском омуле и озерном сиге, и их гибридах, при этом озерно-речной сиг исключен из анализа без объяснений.

Во «**Введении**» представлены основные необходимые позиции: актуальность темы, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение работы, методология и методы диссертационного исследования,

личный вклад автора, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, апробация результатов работы, публикации, объем и структура работы, благодарности. Автор достаточно кратко обосновывает актуальность и проработанность темы, но компенсирует этот недостаток четким описанием теоретической значимости работы. В начале введения автор указывает, что в оз. Байкал «обитает три представителя сиговых рыб», каждый из которых имеет видовой статус, при этом в разделе «Научная новизна» указано, что проведен «анализ ...мозга пелагической (байкальский омуль) и бентической (байкальский озерный сиг) форм». Несмотря на то, что «форма» относится к типу питания, а не к таксономическому статусу, данная фраза вводит в заблуждение в свете основной темы исследования.

Фраза «в условиях *common garden* экспериментов» также вводит в заблуждение. По тексту диссертации она встречается всего 2 раза и в обоих случаях остается без расшифровки и перевода, также отсутствует какое-либо упоминание и описание в материалах и методах. В разделе «Личный вклад автора» указано, что автор участвовал в экспериментальных работах, анализе и интерпретации результатов, но также упоминается, что выполненная работа была «частью работ в группе эволюционной генетики лаборатории ихтиологии ЛИН СО РАН». Не совсем понятно, какая же часть работы была выполнена автором, так как проведение эксперимента по выращиванию рыбы в условиях аквакультуры очень затратно по времени и ресурсам, а опубликованные статьи включают большое количество соавторов.

Глава «**Литературный обзор**» разделена на пять частей (22 страницы). 7 страниц посвящены морфологическому описанию сигов, обитающих в озере Байкал, их образу жизни и питанию, и так как работа не посвящена выяснению таксономического статуса, подобный объем, относительно остальных частей литературного обзора, является излишним. Только 4 страницы посвящены таксономии и филогении сиговых, при этом сигам Байкала уделена всего одна страница. Основным минусом обзора литературы является практически полное отсутствие упоминаний, каким типом маркера было проведено то или иное исследование. Если упоминание митохондриальной ДНК (мтДНК) еще встречается (2 раза без упоминания исследованного фрагмента), то описание исследований микросателлитных локусов ограничивается фразой «Филогеографические исследования «*C. lavaretus complex*» и «*C. artedi complex*» на основе полиморфизма микросателлитных локусов и мтДНК показали, что генетические различия внутри комплексов слабо соответствуют принятой таксономии». Очень жаль, что «10 лет ... молекулярно-филогенетических работ, посвященных взаимоотношениям байкальских сиговых между собой и с другими представителями семейства Coregonidae», уместились на одной странице.

Особенно удачными в обзоре литературы оказались разделы с описанием исследований транскриптомов и микробиомов, которые дают полное и четкое представление о проведенных ранее исследованиях и актуальности используемых методов.

Непонятно, что имеется в виду под фразой «структура ДНК, как правило, менее чувствительна к конвергенции» (стр. 24.).

На стр. 26 имеется фраза «Современный взгляд сформировался в результате представляемых в данной работе комплексных молекулярно-филогенетических исследований происхождения, родственных связей и анализа популяционной структуры байкальских сиговых в контексте эволюции всего рода», при этом дается ссылка на работу 2012 года. Также сообщается, что «целостной картины появления и эволюции сиговых рыб в Байкале предложено не было», при этом отсутствует упоминание вообще каких-либо выдвинутых гипотез и на основании каких данных эти гипотезы были выдвинуты. При учете заявленного в названии «молекулярно-генетического исследования», самим исследованиям, основанным на молекулярно-генетических данных, уделяется мало внимания по сравнению с морфологией.

На стр. 27 написано, что «Существование сходных экологических форм в разных регионах является в этой группе следствием гибридизации и недавней параллельной эволюции», при этом непонятно, какая гибридизация имеется в виду – историческая или современная, так как в тексте упоминается о высокой способности видов к гибридизации.

В тексте присутствуют термины «вид», «форма» и «экотип» применительно к омулю и сигу. Хотелось бы понимать, являются ли они синонимами в понимании автора.

В главе «**Материалы и методы**» содержится 5 таблиц и 1 рисунок и описываются образцы, использованные для анализа, и методы обработки результатов. Глава содержит большое количество подразделов, некоторые из которых содержат только одно предложение. В разделе описаны основные методы, использованные для получения данных, и методы их статистической обработки. Использованные методы представлены современными подходами, такими как транскриптомный и микробиомный анализы. Длина исследованного фрагмента мтДНК (1141 п.н.) достаточна для получения достоверных результатов. Для микросателлитного анализа использовано 9 популяций с достаточным объемом выборки, несмотря на использования всего 5 микросателлитных локусов.

Глава «Материалы и методы» начинается сразу с таблицы, при этом не обозначено, когда и как собирали пробы, какой тип ткани использовали и сколько образцов было, где географически находятся места взятия проб. Из текста создается впечатление, что из каждой локации был взят всего один образец, ни в тексте, ни в Таблице 2 нет четкого обозначения, сколько всего было проанализировано образцов (своих и взятых из GenBank). На стр. 40 есть

лишь краткое упоминание о том, какие образцы были взяты из банка (5 шт.), и получается, что в анализ включены 43 последовательности, полученные автором. Также не обозначено, каким образом автор получил образцы для анализа, это был самостоятельный сбор (Финляндия, Ирландия) или автору предоставили эти образцы, так как источник образцов также не обозначен.

Непонятно, почему использовали именно цитохром b и только один фрагмент, хотелось бы понимать, связано ли это с доступностью данных в GenBank или с другими причинами.

В Таблице 2 у валька (последняя строка и последняя колонка) отсутствует номер, это, скорее всего, связано с отсутствием данной последовательности в филогенетической сети, но нигде не обозначено.

Для анализа использовали MEGA v3.1, это старая версия данной программы (последняя версия 11), и возникает вопрос, почему использовали ее. При этом на стр. 46 указана 7 версия этой же программы.

Для микросателлитного анализа использовали достаточно большие выборки, но создается впечатление, что анализ мтДНК был полностью оторван от микросателлитного анализа. Использовались ли какие-либо образцы в обоих типах анализа?

Из 5 использованных микросателлитных локусов (что не очень много для популяционного анализа) только один локус был разработан для байкальского омуля, при этом в работе Гайкалова с соавторами 2008 года их 3.

Не совсем понятно, почему использовали полиакриламидный гель для визуализации. Сейчас повсеместно используется фрагментный анализ, а при учете использования динуклеотидных локусов полиакриламидный гель является не очень точным.

На стр. 46 часть текста от слов «На основании дефицита...» до слов «...не было найдено ни одного «нулевого» аллеля» относится к результатам, а не к материалам и методам.

Стр. 46: «Древо гаплотипов, основанное на данных полиморфизма микросателлитных локусов, строили, используя генетические расстояния Da». Чаще всего рекомендуют использовать индекс Кавалли–Сфорца, даже при наличии нулевых аллелей. Согласно Сере с соавторами (Sere et al., 2017), это наилучший метод для построения деревьев по микросателлитным локусам. Другой очень важный момент, что микросателлитные локусы, являясь ядерным маркером, диплоидны, соответственно термин «гаплотип» не применим в данном случае. Непонятно, является ли это неумышленной опечаткой автора, хотя данная фраза несколько раз встречается по тексту диссертации, или же связано с незнанием терминологии.

Фраза «Для выявления границ популяций...» на стр. 47 является не корректной. О каких границах идет речь, физических? Программа STRUCTURE используется для выявления скрытой популяционной структуры (подразделенности) на основе частот аллелей.

При анализе микробиомов сравнивали искусственно выращенных рыб и их гибриды. К сожалению, нет сравнения с дикими особями, что было бы особенно интересно в свете адаптации к искусственным условиям.

Таблица 5 должна быть в «Результатах», а не в «Материалах и методах». А Таблица 6 не имеет особого значения для общего понимания работы. К сожалению, отсутствует карта взятия проб для мтДНК, что дало бы более полное понимания исследованного региона. Несмотря на использование 4 типов анализа, методы обработки результатов приведены достаточно кратко, что не всегда идет на пользу работе. Например, выделение ДНК дано ссылкой на статью, хотя диссертационная работа позволяет привести более развернутую методику.

Глава 3 «**Результаты**» включает 4 основные части, соответствующие методам исследования, и содержит наибольшее количество страниц (25), 12 рисунков и 5 таблиц. В главе приведены основные полученные результаты, на основе которых сделаны выводы работы. Данные по мтДНК и микросателлитным локусам оказались значимыми с высокой статистической поддержкой. Было получено достаточное количество контигов в транскриптомном анализе, на основании которых были сделаны выводы о различиях в экспрессии между омулем и сигом. Микробиомный анализ также подтвердил различия между бактериальными сообществами искусственно выращенных омуля, сига и их гибридов.

К сожалению, некоторые рисунки получились неудачными, на ветвях деревьев не обозначена поддержка. Даже при учете того, что «Топологии деревьев MP, ML, ME и NJ были идентичны для всех статистически достоверных узлов» не понятны уровни этой поддержки, различались ли они. Фраза «...с высокой поддержкой (85–100%)» не дает представления о том, какие клады были больше или меньше поддержаны и о причинах этих различий (если они есть). Рисунки 2 и 3 очень маленькие и на них очень тяжело что-либо разглядеть. На Рисунках 4 и 5 плохо видны круги и их принадлежность. Непонятно, почему не использовали Nested Clade Analysis, который используется для идентификации прошлых демографических событий и потока генов.

Генетическое разнообразие как мтДНК, так и микросателлитных локусов описано довольно слабо. На стр. 64 сообщается, что «...наблюдали высокий полиморфизм изученных популяций байкальских сиговых по исследованным локусам» и дается ссылка на Таблицу 7, при том что эта таблица генетической дифференциации. В приложении приводится краткая таблица средних показателей микросателлитных локусов, но нет ни частот аллелей, ни

дополнительной информации. Рисунок 6 не информативен, так как понятно, что количество аллелей на локус будет различаться в популяциях, правильнее было бы сравнивать локусы. Не приведены некоторые показатели микросателлитных локусов (количество приватных аллелей, показатели с учетом корректировки на минимальный объем выборки, мин и макс размер аллелей и тд).

Выводы о прохождении популяций через бутылочное горлышко делаются только на основе индекса Гарза–Вильямсона, что не может быть основанием для подобных выводов. Непонятно, почему не использовали программу BOTTLENECK, которая позволяет использовать разные типы моделей для анализа именно микросателлитных локусов. Также не проведен анализ распределения частот аллелей, который тоже позволяет делать выводы о снижении численности популяций в прошлом.

На Рисунке 7 не указана поддержка ветвей. Непонятно, совпадают ли деревья, построенные разными методами для популяций. Также одна особь озерно-речного сига попала в кластер с омулем, а несколько особей омуля – в группу с озерно-речным сигом, что никак не объясняется, поэтому непонятно, является ли это методической ошибкой или нет (Рисунок 7А).

На стр. 70 сообщается, что «При этом 8 из 9 анализируемых выборок показали статистически достоверные попарные различия по  $F_{st}$ ». Если обратиться к Таблице 7, то видно, что только 2 пары выборок, селегинская-чивыркуйская и селегинская-маломорская, статистически не поддержаны. Каким образом данные из таблицы 7 согласуются с данной фразой, и какая выборка из 9 не показала достоверные различия?

В Таблице 9 не совсем понятно, от чего приведена «доля контигов», так как если суммировать таблицу, то получается 161.2%, а разделение на неповторяющиеся и повторяющиеся контиги не очевидно и не выделено.

Глава 4 «Обсуждение» имеет ту же структуру, что и другие главы. Первый раздел поделен на несколько частей, в которых обсуждается сначала общая эволюция рода *Coregonus*, затем различия мускуна и озерно-речного сига и только потом представлено обсуждение происхождения сиговых озера Байкал. Не очень понятно, почему происхождение озерно-речного сига идет раньше раздела «Происхождение сиговых озера Байкал». В этом разделе приведены основные ссылки на литературные источники, которые ожидаешь увидеть в обзоре литературы.

На стр. 90 говорится о «прохождении популяций через бутылочное горлышко (Garza, Williamson, 2001), что согласуется с результатами анализа генетического полиморфизма мтДНК», при этом в работе анализ мтДНК не связан с анализом микросателлитных локусов, а ссылка не приведена. Делать выводы о событиях в популяциях на основе одного маркера и

всего одного показателя преждевременно. Раздел 4.3 больше похож на обзор литературы, а не на обсуждение полученных результатов, не всегда понятно как предыдущие данные согласуются с результатами диссертационной работы. Также ни в обзоре литературы, ни в обсуждении не приведены показатели генетического разнообразия других исследованных популяций сиговых, что не позволяет читателю сделать самостоятельные выводы о согласованности полученных результатов и выводов автора работы.

На стр. 100 сообщается, что «Индексы разнообразия Chao1 и Shannon показали более низкие значения у байкальских сиговых по сравнению с другими исследованными дикими и выращенными видами рыб», однако в работе нет данных по диким рыбам, поэтому такое сравнение не совсем корректно, так как в лабораторных условиях с ограниченным и контролируемым питанием разнообразие ожидаемо будет ниже.

На стр. 103 есть не совсем корректная фраза «пойманные в неволе».

В «**Заключении**» автор суммирует результаты, полученные с использованием 4 различных методов, и делает выводы о предке байкальских сиговых рыб и формировании популяционной структуры в недавнем геологическом прошлом, после последнего оледенения.

«**Выводы**» соответствуют целям и задачам исследования.

Остается непонятным, почему автор делает выводы «о происхождения байкальских сиговых рыб и в целом рода *Coregonus*» на основании всего одного типа маркера, одного участка мтДНК и одного представителя от популяции. Учитывая высокую способность сигов к гибридизации и наличие описанных популяций с интрогрессией, отсутствие совместных данных по митохондриальному и ядерному маркерам может поставить выводы под сомнение.

К сожалению, автор никаким образом не обозначил и не обсудил работу по полным митохондриальным геномам, проведенным ранее (Teterin et al., 2020), и работу 2009 г. о схожести геномов сига и омуля (Buchenko et al., 2009). В диссертации отмечено, что существует много разных гипотез о происхождении рода *Coregonus*, но они никак не обозначены и не обсуждаются.

Несмотря на последовательное изложение материала и сохранение общей структуры, основной упор в работе делается на анализ митохондриальной ДНК в свете эволюции сиговых и во многом упускаются новые данные, полученные с помощью современных методов. Эволюция сиговых изучается уже несколько десятилетий с использованием как морфологических, так и генетических методов, при этом вопросы симпатрического видообразования остаются не решенными. Автору следовало бы сконцентрироваться на

более актуальных вопросах, при учете того, что выборки из оз. Байкал уже были ранее включены в систематические и эволюционные исследования.

Несмотря все вышеозначенные замечания, работа написана хорошим и понятным языком. По тексту присутствуют не переведенные фамилии зарубежных авторов, а в приложения 2 и 3 даны почти полностью на английском языке. Присутствует ряд опечаток, ошибок в пунктуации и представлении таблиц, что не умаляет качества работы. Автор освоил множество современных методов анализа и провел всестороннее исследование своего объекта. Полученные результаты вносят вклад в понимание эволюции сиговых рыб озера Байкал, а также в понимание механизмов симпатрического видообразования.

Результаты работы опубликованы в 3 статьях в журналах из списка, рекомендованного ВАК, и представлены на 8 конференциях. Автореферат отражает содержание диссертации.

Таким образом, по актуальности, новизне, объему и методическому уровню работы, научной и практической ценности результатов рассматриваемая диссертационная работа соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертационная работа «Молекулярно-генетическое исследование эволюции байкальских сиговых рыб» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции от 11 сентября 2021 года), а ее автор, Сидорова Туяна Валерьевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Кандидат биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика,  
научный сотрудник лаборатории генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук

690041 Владивосток, ул. Пальчевского 17

Тел. 89502888028

E-mail: [jaja@list.ru](mailto:jaja@list.ru)

15 мая 2023 года

Бондарь Евгения Игоревна

Подпись Е.И. Бондарь заверяю

подпись   
заверяю: вед. специалист   
Овчинникова И.В. 

