

ОТЗЫВ

официального оппонента

доктора биологических наук, старшего научного сотрудника, ведущего научного сотрудника Лаборатории экологии низших позвоночных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН **Васильева Виктора Павловича** на диссертацию **Золотовой Анны Олеговны** «Морфологическая и молекулярная изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Osteichthyes: Cyprinidae) с анализом последовательностей ДНК в систематике подсемейства Leuciscinae», представленную на соискание **ученой степени кандидата биологических наук** по специальностям **03.02.06-ихтиология** и **03.02.07-генетика**.

Актуальность темы исследования. Представленная диссертационная работа посвящена исследованию дальневосточных красноперок – одному из немногих представителей семейства Cyprinidae, ведущих проходной образ жизни. Виды рода *Tribolodon* широко распространены в бассейнах окраинных морей Северо-Восточной Азии от Шантарских островов до острова Тайвань. Эти рыбы имеют хозяйственное значение как объекты рыболовства, а также являются промысловыми видами в прибрежных водах некоторых морей.

Как указывает диссертант, исследования дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* ранее проводили либо при помощи традиционных морфологических методов, либо на основе генетического анализа, на выборках особей, собранных в разные периоды и/или в разных районах видовых ареалов, тогда как комплексных исследований этих рыб ранее не проводилось. Представленная работа Анны Олеговны Золотовой посвящена выявлению особенностей внутри- и межвидовой изменчивости, уровня дифференциации дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* и их филогенетических отношений на основании комплексного молекулярно-генетического и сравнительно-морфологического подходов. Данная диссертация является пионерской работой для рода *Tribolodon*, выполненной на стыке популяционной генетики и морфологии, чем определяется ее актуальность.

Новизна исследований, научных результатов и выводов диссертации. На основе комплексного подхода А.О. Золотовой впервые исследована внутривидовая изменчивость и межвидовая дивергенция дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*. При помощи молекулярно-генетических методов в диссертации подтверждены ранее полученные результаты по маркерам *Co-1* и *Cyt-b*. Приведены доказательства в пользу гипотезы о невозможности однозначной видовой идентификации отдельных представителей семейства

Cyprinidae при помощи маркера *Rho*. Особое внимание в работе уделено новому, ранее не применявшемуся для изучения рода *Tribolodon*, маркеру – внутригенному спейсеру рРНК *ITS-1–5.8S–ITS-2 (ITS-1,2)*. А.О. Золотовой показано, что последовательности нуклеотидов *ITS-1-2* характеризуются участками уникальными для каждого из трёх исследованных видов. Разработанная автором таблица для фрагментов *ITS-1-2* позволяет успешно отличать один вид от другого, а также идентифицировать межвидовых гибридов.

При помощи сопоставления данных морфологического и молекулярно-генетического анализов в диссертации показано, что для первичного определения гибридов между *T. brandtii* и *T. hakonensis* юга Приморского края в полевых условиях можно использовать признак «наличие или отсутствие соединения между *CSO* и *CIO*», а наиболее точно идентифицировать гибриды между *T. brandtii* и *T. hakonensis* возможно по *p*-расстояниям при совместном анализе маркеров мтДНК и яДНК, при помощи RDP-анализа и специальной таблицы по маркеру *ITS-1-2*.

Особого внимания заслуживает анализ внутри- и межвидового потока генов на примере *T. hakonensis* и *T. brandtii*. Впервые рассчитаны значения потока генов между популяциями *T. hakonensis*, и между популяциями *T. hakonensis* и *T. brandtii* из Приморского края. Впервые для дальневосточных красноперок проведен ABGD-анализ по каждому исследованному маркеру и его сопоставление с филогенетическими реконструкциями.

Структура диссертационной работы. Диссертационная работа А.О. Золотовой общим объемом в 238 страниц состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который содержит 214 источников, из них 141 на иностранных языках. Для достижения цели диссертационной работы поставлено 5 задач, сформулированы два положения, которые вынесены на защиту. Содержание работы соответствует заявленной теме.

Текст рукописи хорошо иллюстрирован. Одну четвертую часть работы занимает приложение. Решение автора не загромождать основной текст диссертации, а вынести часть таблиц и рисунков (25 таблиц и 3 рисунка) за его пределы представляется неудачным, т.к. создает неудобство при чтении работы.

Во **Введении** диссертант освещает актуальность и степень «разработанности» темы исследований, его цель и задачи, научную новизну работы, теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, личный вклад автора, сведения по апробации работы и публикациям, структуре и объему работы.

К сожалению, в этой части диссертации режет глаз неправильное написание подсемейства ельцовых рыб, к которому относят дальневосточных красноперок Kartavtsev et

al. (2017): Foxiniinae вместо Phoxiniinae (стр. 9), а также некорректное цитирование работы Берга (1916), который на самом деле признавал всего один вид - *Leuciscus brandtii* с авторством Дыбовского (!), а не Берга (как получается из последнего параграфа на стр. 9 диссертации), а в синонимию включал названия этого вида, приведенные в разных работах предшественников. Некорректно представлена ситуация с *Tribolodon hakonensis ezoe* (стр. 10). Все это свидетельствует о недостаточной компетентности диссертанта в вопросах зоологической номенклатуры и практической таксономии. Об этом же свидетельствует и начало главы 1 (Обзор литературы) (стр. 17 и два первых абзаца на стр. 18). На будущее диссертанту можно порекомендовать изучить Кодекс Зоологической номенклатуры и пользоваться (если не первоисточниками) то хотя бы не популярным сайтом FishBase, а сайтом Калифорнийской академии наук.

В упомянутой **Первой главе** автор достаточно подробно освещает опубликованные ранее работы по исследованию разных морфологических структур, обоняния, особенностям «экологии и нереста» у дальневосточных красноперок, а также исследования, проведенные при помощи молекулярных методов, начиная от белковых маркеров, заканчивая ПДРФ-анализом и анализом последовательностей нуклеотидов. Соответственно эта глава разделяется на разделы с очень неудачной рубрикацией. Часть этой главы, озаглавленная как «**1.1. Морфологические отличия**», по-видимому, должна служить введением в обзор работ по морфологии, однако такого введения не получилось. В этой части автору следовало четко определить, что промеры АВ, АС и АД (стр. 18) – это разные способы измерения **длины тела**. Непонятно, почему вслед за работами, посвященными конкретным морфологическим структурам в эту же часть главы попали разделы «**1.1.5. Обонятельная реакция**», «**1.1.6. Экология и нерест**» и «**1.1.7. Икра**». Во второй части главы «**1.2. Молекулярно-генетические исследования**» представляется совершенно излишним представленный в качестве введения подробный обзор работы по виду *Gila seminuda*, относящемуся совершенно к другому подсемейству ельцовых рыб. Эта часть главы не делится на разделы, хотя в детальном обзоре генетических исследований собственно красноперок, по-видимому, следовало отдельно выделить анализ аллозимов, работы по морфологии генотипированных популяций и кариологии. Третья часть обзора литературы посвящена описанию исследований по естественным гибридам видов рода *Tribolodon*, искусственной гибридизации и эмбриональному развитию видов и гибридов.

Во **Второй главе** диссертации представлено описание изученного материала и методов исследования. Следует отметить, что, согласно приведенным данным, диагностика видов проводилась на основе ключей из работ: Гавренков, Свиридов, 2001; Линдберг, Легеза,

1965; Nakabo, 2002. Только один экземпляр из общей совокупности в 161 экз. не удалось определить по морфологическим признакам, этот экземпляр не был включен в исследования.

Автор подробно описывает основные этапы морфологического анализа, давая соответствующие иллюстрации, и приводит детальную пропись для молекулярно-генетического анализа и параметров дальнейших расчетов с пояснениями выбора тех или иных характеристик. Особенно подробно описана диагностика рекомбинантных последовательностей (RDP-анализ), применявшаяся для выявления гибридных особей.

При проведении морфологических исследований диссертант по непонятной причине руководствовался не основными исследованиями по морфологии рыб изучаемой группы, а «рекомендациями Богуцкой с соавторами», основанными на рыбах бассейна Каспийского моря – «Богуцкая и др., 2013» (стр. 45). Поскольку в диссертации дана только ссылка на работу Armbruster, 2012, то осталось неясным, какой именно морфометрической методикой из числа приводимых в этой публикации диссертант пользовался при промерах рыб: GM, LBM или TM? Не очень понятен также смысл использования «таблицы сопоставлений» из работы Богуцкой с соавторами (Bogutskaia et al., 2017) по роду *Alburnus*.

Хотя Анна Олеговна и руководствовалась работой Богуцкой с соавторами (2013) при подсчете числа лучей в плавниках термин «подкожные лучи», широко используемый в диссертации (стр. 46, 47, 86, 128, 129), является ее собственным изобретением, равно как и объединение (!) ветвистых и неветвистых лучей (стр. 46), постоянное использование написания «дорзальный» вместо «дорсальный» и способы измерения длины рыла и постдорсального расстояния, показанные на рис. 2.1.2.2 (на этом рисунке вызывает вопрос загадочная точка «1», которая почему-то не использовалась, хотя именно от нее, а не от точки «2» следовало измерять длину тела, длину головы и др.). В этой связи диссертанту, очевидно, следовало ознакомиться с классическими работами и учебниками или учебными пособиями по анатомии рыб и более внимательно посмотреть цитируемые в диссертации работы по морфометрии. К сожалению, здесь следует отметить и невнятное определение использованной стандартной длины тела (SL) (стр. 54 и рис. 2.1.2.2), при этом на стр. 92 и на рис. 3.1.1.3.1 имеется совсем уже фантастическое ее определение: «в боковой линии от конца головы **до конца хвостового плавника (SL)**».

К этой главе имеются вопросы и по статистическому анализу, например что означает «значение t-критерия Стьюдента составляли $P \leq 0,05$ » (стр. 46)? Неясно, каким образом определялось «максимальное, минимальное и среднее числа позвонков для всех исследованных отделов» у *T. brandtii* из р. Найба (стр. 51), где выборка состояла из одной особи (Табл. 2.1).

В главе 3 представлены результаты диссертационной работы. В преамбуле диссертантом указано, что среди первично идентифицированных по внешней морфологии особей трех видов на основе генетического анализа были выявлены 2 экз., которым «был присвоен статус потенциальных гибридов» (стр. 86). Однако, остается неясным: сколько особей было на самом деле верифицировано, поскольку, судя по таблице 1 Приложения, для генетических исследований диссертантом было использовано 109 образцов от красноперок, а всего, согласно таблице 2.1, было 160 рыб. В любом случае для целого ряда выборок некорректно применение статистического анализа, поскольку эти выборки не являются репрезентативными: все выборки *T. sachalinensis* и сахалинские выборки двух других видов (кроме зал. Анива). Это относится к таблицам 3.1.1.1.1 – и к таблицам 3-7, 9, 11 Приложения, где для нерепрезентативных выборок следовало привести только средние значения, а для *T. brandtii* из р. Найба, как уже отмечалось выше, должно было быть лишь одно значение. При сравнительном анализе выборок диссертант мог использовать непараметрический U-критерий Манна-Уитни, поскольку он подходит для сравнения малых выборок, однако сравнение нерепрезентативных выборок по критерию Стьюдента (табл. 12 Приложения) некорректно. Аналогично и применение теста Левена (табл. 13 Приложения) для нерепрезентативных выборок, по которым нельзя рассчитывать дисперсию, некорректно.

Трактовка диссертантом собственных результатов морфологического анализа в ряде случаев вызывает недоумение и вопросы. Так со ссылкой на табл. 3.1.1.1.1 утверждается, что «различий между видами и внутривидовыми локальными группировками по числу лучей в ... анальном, брюшном, грудном ... плавниках не обнаружено» (стр. 86), тогда как по данным таблицы достоверно различаются, например, по А выборки двух видов из б. Киевка и выборки *T. hakonensis* из б. Киевка и Людоги. Утверждается, что «критерием Манна-Уитни была выявлена **индивидуальная изменчивость** по числу лучей в анальном плавнике ...» (стр. 86), тогда как этот критерий предназначен для выявления различий между выборками. Зачем в рисунки 3.1.1.2.1 - 3.1.1.2.2 включен признак «преанальные хвостовые позвонки», если данные по ним не приводятся? В случае числа ребер на чешуе для демонстрации перекрывания (стр. 95) следовало приводить не средние значения, а диапазоны изменчивости.

Результаты молекулярно-генетического анализа, полученные на основе использования как митохондриальных, так и ядерных генов в целом не вызывают возражений и вопросов за исключением представленной попытки «реконструкции филогенетических деревьев для Leuciscinae» (стр. 126). К сожалению, диссертанту осталась неизвестной фундаментальная работа Schönhuth et al. (2018), посвященная филогенетическим

связям и современной классификации семейства Leuciscidae. В этом исследовании, базирующемся на широком охвате (358) таксонов и использовании как митохондриальных, так и ядерных генов, убедительно показано, что виды рода *Tribolodon* принадлежат к филогенетической кладе **сестринской** по отношению к кладе, рассматриваемой в статусе подсемейства Leuciscinae. Из последней богатой видами и родами клады в диссертации в филограмме на рис. 2 Приложения представлен всего один вид – *Leuciscus waleckii*. Собственно и из рассуждений и построения схем (рис. 2, 3) так и осталось неясным: что подразумевает диссертант под Leuciscinae s. lato и Leuciscinae s. stricto.

Глава Четвертая – Обсуждение – так же, как предыдущие, разбита на разделы, посвященные разным системам морфологических признаков и молекулярно-генетическим исследованиям. В каждом подразделе автор приводит сопоставление своих данных с ранее опубликованными материалами и завершает его небольшим заключением. По-видимому, логичнее было бы объединить результаты и обсуждение, сделав две главы – по морфологическим и молекулярно-генетическим результатам. В этом случае в обсуждении не было бы повтора из результатов.

Несомненный интерес представляет раздел, посвященный двум гибридным особям, выявленным на основе молекулярных данных. К сожалению, для одного из этих гибридов морфологические характеристики получить не удалось, а второй гибрид, почему-то рассматриваемый в качестве возвратного гибрида без каких-либо доказательств, характеризовался либо промежуточными значениями изученных морфологических признаков, либо обнаруживал наследование по отцовской линии.

Краткое **Заключение** предваряет **Выводы**. На основании полученных результатов работы автором представлены шесть выводов, которые основаны на изучении репрезентативного материала и анализа с использованием методов статистики, достоверность математических выкладок подтверждена указаниями показателей статистической значимости.

Заключение.

На основе вышесказанного, можно сделать заключение, что диссертационная работа Золотовой А.О. выполнена на хорошем методическом и общебиологическом уровне. Значительная часть полученных результатов являются абсолютно новыми. Особо следует отметить совместные морфологические и молекулярно-генетические результаты по идентификации видов и их гибридов. Представляет также интерес анализ филогенетических связей р. *Tribolodon* и других представителей сем. Leuciscidae. Автореферат отражает структуру и содержательную часть диссертации, выводы соответствуют полученным результатам. Список из 12 работ, из которых 3 опубликованы в изданиях из списка ВАК,

дает достаточно исчерпывающее представление об итогах исследований и высоком уровне квалификации диссертанта. Сделанные замечания носят частный характер и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа «Морфологическая и молекулярная изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Osteichthyes: Cyprinidae) с анализом последовательностей ДНК в систематике подсемейства Leuciscinae» соответствует основным критериям (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Золотова Анна Олеговна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06-ихтиология и 03.02.07-генетика

17 апреля 2019 г.

д.б.н., ст.н.с., в.н.с. Лаборатории

экологии низших позвоночных молекулярная изменчивость дальневосточных

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Институт

проблем экологии и эволюции им. А.Н.

Северцова РАН

Виктор Павлович Васильев

119071, Москва, Ленинский проспект, 33

Тел: 8 (495) 954-10-36

E-mail: admin@sevin.ru

Подпись В.П. Васильева подтверждаю

Ученый секретарь Федерального

государственного бюджетного

учреждения науки Институт проблем

экологии и эволюции им. А.Н.

Северцова РАН

