

УТВЕРЖДАЮ

Проректор – начальник  
Управления научной политики  
и организации научных исследований

МГУ имени М.В.Ломоносова,

А.А.Федянин



« 19 » апреля 2019 года

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Золотовой Анны Олеговны

«Морфологическая и молекулярная изменчивость дальневосточных красноперок рода *Tribolodon* (Osteichthyes: Cyprinidae) с анализом последовательностей ДНК в систематике подсемейства Leuciscinae», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология, 03.02.07 – генетика

#### Актуальность темы диссертации

Диссертационная работа Золотовой А.О. посвящена анализу морфологической и молекулярно-генетической изменчивости у трех видов дальневосточных красноперок рода *Tribolodon*, которые широко распространены в Приморье и на Сахалине, являются массовыми представителями экосистем, а также имеют хозяйственное значение. Число видов красноперок и точные границы их ареалов однозначно не установлены, так по мнению разных авторов, число видов варьирует от 3 до 5. Актуальность работы Золотовой А.О., связана с поиском и оценкой пригодности различных морфологических и молекулярных признаков для идентификации разных видов и основных филогенетических групп внутри них.

#### Структура и содержание работы

Диссертация состоит из введения, 4 глав, Заключения, Выводов, Списка сокращений, Списка литературы и Приложения. Работа изложена на 238 страницах текста, содержит 30 таблиц и 42 рисунка. Список литературы включает 214 работы, из них 141 на иностранных языках.

Во введении автор обосновывает актуальность работы, описывает степень разработанности темы исследования на данный момент, формулирует цель и задачи

исследования, его научную и теоретическую значимость и положения, которые выносятся на защиту.

В главе 1. «Обзор литературы» автором дан краткий обзор литературы по основным вопросам, которые имеют отношение к теме выполненного им исследования, В частности, автор описывает краткую историю изучения и идентификации дальневосточных красноперок с помощью разных морфологических и генетических признаков, приводит точки зрения разных авторов на их таксономию и данные по гибридизации разных видов.

В главе 2. «Материалы и Методы» приводятся данные по собранному материалу, который включает 6 выборок крупночешуйной красноперки *T. hakonensis* (75 экз.), 4 выборки мелкочешуйной красноперки *T. brandtii* – (49 экз.) и 2 выборки сахалинской красноперки *T. sachalinensis* (9 экз.) из водоемов Приморского края и Сахалина. Описаны методики анализа пластических и меристических морфологических признаков, включая анализ с помощью рентгенограмм, а также анализ каналов сейсмодатчика системы. Приводятся методики выделения ДНК, амплификации и секвенирования 2 митохондриальных генов (цитохром оксидаза *c*, субъединица 1 (*Co-1*) и цитохром *b* (*Cyt-b*)) и двух фрагментов ядерной ДНК: ген родопсина (*Rho*) и участок рибосомальной ДНК, включающий 5.8S субъединицу и два внутренних спейсера (*ITS-1*, *ITS2*), который авторы обозначили как *ITS-1,2* фрагмент. Общая длина секвенированных и выровненных последовательностей всех фрагментов составила 2903 пары нуклеотидов. Описаны подходы по анализу нуклеотидных последовательностей, которые включают анализ изменчивости, генного потока между локальностями и видами, поиск рекомбинаций, построение филогенетических деревьев, диагностирование видов с помощью автоматического баркодирования (*ABGD web*).

В главе 3. «Результаты» приведены основные результаты проведенного исследования по морфологическим и молекулярным признакам. Среди морфологических признаков, некоторые признаки не пригодны для идентификации видов (например, пластические признаки, общее число позвонков), другие признаки, например, число чешуй (разные варианты промеров) с трудом позволяют идентифицировать только пару видов, так как отмечена высокая внутривидовая изменчивость по этим признакам. В целом, идентификация трех видов возможна только при использовании набора из нескольких морфологических признаков. Использование двух митохондриальных генов (раздельно и вместе) позволяет дифференцировать три вида и несколько локальных групп внутри них. Данные по гену родопсина (*Rho*) не могут быть использованы для видовой идентификации, ввиду низкого уровня изменчивости и отсутствия четко обособленных

клад разных видов на всех филогенетических деревьях. Анализ данных по рибосомальному фрагменту ITS-1,2 позволяет идентифицировать все три вида и их гибридов. На филогенетических деревьях, построенных по объединенным последовательностям двух ядерных фрагментов (ITS-1,2 + Rho) каждый из трех видов образует свою кладу. Важно отметить, что при анализе разных генов выявляются два разных варианта сестринских отношений между изученными видами. Две особи красноперок, которых авторы определили, как потенциальных гибридов, на мтДНК деревьях попадают в кладу *T. brandti*, а при анализе ядерных последовательностей, один попадает в кладу *T. brandti*, а второй – в кладу *T. hakonensis* + *T. sachalinensis*. При использовании разных моделей нуклеотидных замен и программы автоматического баркодинга ABGDweb, разные, а также и некоторые отдельные фрагменты ДНК дают разное число таксономических групп.

Анализ рекомбинационных участков в объединённых последовательностях всех изученных генов с помощью разных программ, включенных в пакет RDP, выявил 5 потенциальных участков, из которых только один был выявлен при разных вариантах анализа. Этот участок был выявлен у одного из потенциальных гибридов, а второй потенциальный гибрид при одном из анализов был идентифицирован как отдельный вид.

В главе 4. «Обсуждение результатов» автором кратко обсуждаются изменчивость разных морфологических признаков и их пригодность для идентификации трех видов. Для первичной идентификации трех видов рекомендуется использовать данные по строению сейсмодатированной системы. Автор отмечает, что картина генетической дифференциации трех видов дальневосточных красноперок по разным молекулярным маркерам существенно различается, что требует в будущем включение в анализ новых маркеров. Отмечается значительная генетическая дифференциация между популяциями *T. hakonensis* из северной и южной частей ареала. На некоторых филогенетических деревьях у этого вида выделяются две хорошо статистически поддержанные клады, представленные популяциями с севера и юга соответственно. Некоторые авторы (Семина и др., 2006, 2007) предлагали придать им статус номинальных видов. Сравнивая результаты анализов морфологических и генетических признаков, автор отмечает, что так как ареалы разных видов красноперок перекрываются и есть данные в пользу их гибридизации, то это усложняет анализ и интерпретацию полученных результатов. Приводятся литературные данные по распределению отдельных признаков у гибридов между разными видами красноперок. Обсуждаются результаты анализа двух особей красноперок, которых автор, первоначально определил, как потенциальные гибриды. Для одной особи *T. brandtii* × *T. hakonensis* №3 (TBV003NTHV03\_03) не удалось сохранить



этикетки и сопоставление морфологических и молекулярных признаков для неё не проводилось. У второй особи (*T. brandtii* × *T. hakonensis*) × *T. brandtii* № 12) часть морфологических признаков имело промежуточное значение между родительскими видами, по другим признакам эта особь близка к *T. hakonensis*. Тем не менее, программа ABGDweb, как и разные методы филогенетического анализа молекулярных маркеров относят эту особь к *T. brandtii*. Автор предполагает, что эта особь возникла в результате возвратного скрещивания F1 и *T. brandtii*, а особь *T. brandtii* × *T. hakonensis* №3 (TBV003NTHV03\_03) является гибридом первого поколения от скрещивания самки *T. brandtii* и самца *T. hakonensis*. Обсуждаются результаты анализа филогенетических отношений между красноперками рода *Tribolodon* и других представителей *Leuciscinae* (использованы свои данные и последовательности из Genbank), полученные при анализе гена *cyt b* и 13 белок-кодирующих генов мтДНК. По этим данным дальневосточные красноперки рода *Tribolodon* филогенетически близки к амурскому жериху *Pseudaspius leptocerphalus*. Внутри подсемейства *Leuciscinae* представители 4-х родов (*Tribolodon*, *Pseudaspis*, *Phoxinus* (*Rhynchocypris*) и *Oreoleuciscus*) образуют отдельную кладу.

В Заключении и в Выводах кратко сформулированы основные результаты.

Полученные автором результаты опубликованы в трех статьях в журналах из списка ВАК, из них в двух иностранных.

#### **Научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений**

Проведено комплексное исследование видов рода *Tribolodon* и их гибридов с использованием сравнительно-морфологического и молекулярно-генетического методов, причем среди молекулярных маркеров есть ядерные и митохондриальные гены. Для трех видов рода *Tribolodon* (*T. hakonensis*, *T. brandtii* и *T. sachalinensis*) изучена нуклеотидная последовательность внутренних спейсеров рРНК *ITS-1,2* и показано, что эти виды дальневосточных красноперок хорошо различаются по данному маркеру яДНК. На основании данных по *Cyt-b* и объединенных последовательностей 13 генов мтДНК показано положение видов рода *Tribolodon* и их ближайших родственников в системе *Leuciscinae sensu lato*.

Составлена коллекция ваучерных экземпляров рода *Tribolodon* согласно принятым правилам международной программы iBOL ([www.ibol.org](http://www.ibol.org)) и базы данных BOLD ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org); Ratnasingham, Hebert, 2007; Steinke, Hanner, 2011).

В целом, полученные результаты достоверны, а сделанные на их основе заключения обоснованы.

#### **Практическая ценность результатов.**

Полученные результаты анализа изменчивости и генетической дифференциации популяций могут быть использованы при планировании различных рыбохозяйственных мероприятий. Выявленные автором морфологические и генетические признаки могут быть использованы для идентификации трех видов красноперок и их гибридов.

### **Недостатки в диссертации и автореферате**

Статья написана хорошим и понятным языком, однако есть отдельные выражения, смысл которых не совсем ясен. Например, на с. 149 автор пишет: «Выполненный анализ подтвердил монофилию группы ельцов (*sensu stricto*) в пределах топологии *Leuciscinae sensu lato*, поддерживая **состоятельность подсемейства Phoxinae** с родами *Tribolodon*, *Oreoleuciscus*, *Pseudaspius* и *Phoxinus (Rhynchocypris)* Дальнего Востока (Богущая, 1990; Картавцев и др., 2002), **отделенных от подсемейства Phoxinae** в семействе *Leuciscidae* (Chen, Mayden, 2009)».

В диссертации подписи к некоторым рисункам и таблицам не дают полного разъяснения представленных данных, что затрудняет понимание. Например, в диссертации на рис. 2.1 представлена карта-схема мест взятия выборок, но сами места не подписаны. Нет пояснений какие позиции соответствуют двум внутренним спейсерам и 5.8S субъединице в объединенном фрагменте ITS-1,2. В диссертации явно не хватает карты-схемы ареалов всех видов *Tribolodon*.

Не совсем понятно, зачем автор объединил последовательности ядерных и митохондриальных генов вместе при выявлении рекомбинантных участков и тем более при анализе генного потока, имея ввиду, что два генома имеют разную ploidy и к тому же генный поток может быть асимметричным в отношении разных полов? Если проводить объединение данных для этих видов анализа, то данные по ядерным и митохондриальным генам надо анализировать отдельно. Необходимо четко указать в каких генах и в каких позициях находятся предполагаемые рекомбинантные участки. Автор в диссертации и в автореферате пишет о наличии или отсутствии статистической значимости оценок генного потока между разными популяциями ( $N_m$ ), которые он получил при использовании программ пакета DNASP5. Здесь, скорее всего, автор допускает некоторую путаницу в понятиях и на самом деле речь идет не о значимости оценок числа мигрантов ( $N_m$ ), а о значимости оценок индексов генетической дифференциации популяций ( $F_{st}$ ,  $G_{st}$ ,  $\Gamma_{ST}$  и др), которая оценивалась с помощью хи-квадрат или пермутационного тестов. Например, при анализе уровня генного потока между популяциями *T. hakonensis* из бухты Киевка и залива Восток автором получены значения ( $N_m=9.33$ ,  $P<0.05$ ), которые означают, что не смотря на значительный поток

генов между локальностями ( $Nm=9.33$ ), генетическая дифференциация популяций (значение  $\Gamma_{ST}$ ) статистически значима ( $P<0.05$ ).

Автор часто в тексте ссылается на результаты анализа по участку ITS-1,2 (Табл.19), в том числе, когда речь идет о потенциальных гибридах, однако их последовательности в этой таблице не приведены, а надо было привести.

**Соответствие содержания автореферата указанным специальностям**

Содержание автореферата диссертации соответствует специальностям 03.02.06 – ихтиология, 03.02.07 – генетика.

**Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации**

Содержание автореферата диссертации соответствует содержанию диссертации.

**Значимость результатов для науки и производства**

Результаты исследования имеют научную значимость, способствуя лучшему пониманию структуры изученных видов, их эволюционных и систематических отношений.

**Заключение о соответствии работы требованиям ВАК**

Диссертация соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 №723 и от 21.04.2016 №335), а её автор Золотова Анна Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология, 03.02.07 – генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры ихтиологии МГУ (протокол №226 от 9.04.2019).

Отзыв подготовил

в.н.с. д.б.н.



А.Г.Осинов

Заведующий кафедрой ихтиологии

академик



Д.С.Павлов





### Сведения о ведущей организации

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, МГУ имени М.В.Ломоносова, или МГУ
Ведомственная принадлежность	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Место нахождения	г. Москва
Почтовый индекс, адрес организации	119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1
Адрес официального сайта в сети Интернет	www.msu.ru
Телефон	(495) 939-27-29
Адрес электронной почты	info@rector.msu.ru
Список публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>1. Osinov A.G., Senchukova A.L., Muge N.S., Pavlov S.D., Chereshev I.A. "Speciation and genetic divergence of three species of charrs from ancient Lake El'gygytgyn (Chukotka) and their phylogenetic relationships with other representatives of the genus <i>Salvelinus</i>". Biological Journal of the Linnean Society. 2015.V.116.No.1: 63-85.</p> <p>2. Осинов А.Г., Павлов Д.А., Волков А.А. К вопросу о происхождении озёрных гольцов <i>Salvelinus alpinus</i> complex из бассейнов Колымы и Охотского моря. Вопросы ихтиологии. 2018. Т.58. № 3: 313- 330.</p> <p>3. Сошнина В.А., Павлов С.Д., Зеленина Д.А. Генетическое разнообразие гольцов Командорских островов по результатам исследования митохондриальной ДНК. Генетика. 2016. Т. 52. № 11. С.: 1336- 1341.</p> <p>4. Салтыкова Е.А., Маркевич Г.Н., Есин Е.В., Кузищин К.В. К вопросу о структуре «букетов форм» у рыб: направления дивергенции костей спланхнокраниума в группе эндемичных гольцов-бентофагов (род <i>Salvelinus</i>, Salmonidae, Teleostei) озера Кроноцкое, Камчатка. Доклады Академии наук. 2015. Т. 464. № 1. С. 118-124.</p>

«Верно»

Проректор –  
начальник Управления научной политики  
и организации научных исследований  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
А.Федянин

« 19 » апреля \_\_\_\_\_ 2019 года.

