

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Сергеева Алексея Алексеевича

«ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ РУССКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER GUELDENSTAEDTII* BRANDT, 1833»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа А.А. Сергеева посвящена актуальной теме – анализу внутривидовой популяционной структуры русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) и его филогенетических связей с другими видами осетровых рыб. Русский осётр – ценный объект аквакультуры, а в прошлом – важнейший вид промысловых рыб, и изучение его генетической структуры несомненно создает предпосылки не только для инвентаризации нынешнего, практически искусственно поддерживаемого генофонда, но и, в перспективе – для восстановления природных популяций. Цель и задачи диссертационной работы чётко сформулированы, научная новизна несомненна, работа тщательно спланирована.

СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.

Диссертационная работа А.А. Сергеева, представленная к защите, имеет традиционную структуру. Она состоит из Введения, Обзора литературы (Глава 1), Главы 2 Материалы и методы, Главы 3 Результаты, Главы 4 Обсуждение, Заключения, Выводов, Списка сокращений, Списка литературы и двух Приложений с табличным материалом. Диссертационная работа изложена на 120 страницах, содержит 25 рисунков, 18 таблиц. Список цитированной литературы включает 178 источников, из них 123 на русском языке.

Актуальность, новизна, цели и задачи работы изложены во **Введении**.

Глава 1. Обзор литературы.

Обзор литературы весьма информативен, он даёт представление об состоянии исследований популяционной структуры и таксономии осетровых рыб. Автор

рассматривает происхождение и таксономическое положение отр. Осетрообразных, филогенетические взаимоотношения между видами и родами сем. Осетровых. Оценивается прошлый опыт применения молекулярных маркеров для решения сложных таксономических и популяционно-генетических вопросов осетровых и обосновывается необходимость расширения их набора за счёт маркеров ядерной локализации. Подробно рассматривается состояние вопроса о структуре комплекса видов русского осетра, включая его взаимоотношения с персидским, сибирским и другими видами.

Глава 2 **Материалы и методы**, в частности, содержит описание использованного материала. Образцы тканей осетра собирались в течение 14 лет начиная с 2002 г. На с. 32 общее число обработанных генетическими методами проб обозначено как впечатляющие 1163 особи, однако разобраться сколько, каких именно особей и по каким маркерам было проанализировано не так просто из-за отсутствия таблицы, в которой это систематически изложено. Отдельные таблицы с численностями выборок приведены в разделах Главы 3. Очевидно, что основой анализа были ювенильные особи, которые отлавливались в ходе покатной миграции или морских съёмок, а также во время бонитировок на ОРЗ. От производителей в основном использовались неинвазивные пробы – клипы плавников. Морфологические исследования русского и персидского осетров были проведены на выборках численностью 82 и 72 особи, соответственно.

Методическая база работы – комплекс традиционных ихтиологических методов анализа фенотипа и современных молекулярных методов, которые описаны достаточно подробно. Выделение ДНК и оценка концентрации и качества выделенных препаратов описаны в разделе 2.3.

Анализ митотипов с дифференциацией их на типично «русские» (GUE), «сибирские» (BAE) и «сибирского типа» (BL) проводили с помощью электрофоретического анализа продуктов ПЦР с видоспецифическими праймерами в агарозном геле. Условия ПЦР-реакций и электрофореза описаны достаточно подробно для их воспроизведения. То же можно сказать и о методах AFLP и SNP (с применением “primer extension”), описанных соответственно в 2.5 и 2.6. Метод

секвенирования контрольного региона мтДНК применялся автором для решения задачи мониторинга молоди осетровых (2.7). Микросателлитный анализ организованных в мультиплексные панели SSR-локусов также использовался для мониторинга молоди.

Данные методы и ранее показали свою эффективность, но столь массовое тестирование сотен рыб из природы и с ОРЗ было проведено впервые. В целом комбинация использованных молекулярно-генетических методов делает данное исследование современным и позволяет решить поставленные задачи. Судя по тексту диссертации, автор свободно владеет методами, которые он описывает и количество различных методик, освоенных диссертантом, и качество представления методической части работы производит хорошее впечатление.

Раздел 2.9 посвящён статистической обработке результатов генетического мониторинга молоди осетровых, однако в этой главе лишь цитируется программа ТРА v.02 без разбора собственно методов определения родительских пар для каждой особи молоди. Остальные использованные статистические методы и компьютерные программы кратко упоминаются в различных главах диссертации.

Глава 3. Результаты.

В разделе 3.1 автор излагает результаты анализа генетического полиморфизма ремонтно-маточных стад русского осетра волжских ОРЗ. Выявлен высокий уровень изменчивости как по мтДНК, так и по микросателлитным локусам. Это результат интересен тем, что с учётом сложной истории вида, особенно после потери большей части естественных нерестилищ можно было бы ожидать существенного генетического обеднения.

Раздел 3.2 посвящён анализу распределения митотипов у морфологически определяемых как русский и персидский осётр особей из разных водоёмов каспийского бассейна. Показано, что митотип GUE характерен для Каспия и Азово-Черноморского бассейна, 30% популяций Северного Каспия представлено BL-митотипом, а сибирский осётр Сибири имеет свой ВАЕ-митотип. Все эти наблюдения были сделаны и опубликованы ранее, в том числе одним из руководителей

диссертанта, однако лишь в рамках рассматриваемой работы были проанализированы репрезентативные выборки, более тщательно анализировалась морфология рыб и появилась возможность сравнить диагнозы по митохондриальной ДНК с анализом мультилокусных ядерных генотипов.

Раздел 3.3 – приводятся результаты анализа выборок русского и персидского осетров методом AFLP. Полученная дендрограмма с высокими значениями бутстрэп-поддержки иллюстрирует интересный факт близости по ядерным маркерам русского и персидского осетров Каспия и внешнее по отношению к этой группе положение русского осетра Азовского бассейна. Сибирский осётр ожидаемо занимает позицию наиболее дифференцированного вида.

Раздел 3.4 – Интересные результаты автор получил по сопряжённой оценке морфометрической и генетической изменчивости осетров русского и персидского морфотипов С. Каспия. Морфометрический анализ показал дискриминацию видов по комплексу признаков, выделены те из них, которые вносят максимальный вклад в дифференциацию. Адекватность видовой идентификации автор проверяет с помощью ожидаемых и наблюдаемых частот BL-митотипа в выборках.

Раздел 3.5. В данном разделе приводятся результаты анализа внутри- и межвидовой дифференциации русского, персидского и сибирского осетров по ранее отобранному ОНП (SNP) ядерных локусов ДНК (локализация в ядерном геноме проверена в ходе работы). Топология дерева по ОНП хорошо совпала с полученной по маркерам AFLP. Интересно, что выборки персидского осетра Северного и Южного Каспия в этом виде анализа кластеризовались вместе, чего не наблюдалось в анализе AFLP, что автор трактует как недавнее происхождение этой формы русского осетра, не накопившей генетических различий, превышающих различия между азовской и каспийской популяциями русского осетра. Также следует обратить внимание на близость русского осетра Ю. Каспия азовским осетрам и персидским, но не русскому осетру С. Каспия, что трактуется как примесь в выборке из Ю. Каспия персидского осетра из-за не столь тщательного отбора по морфометрическим параметрам.

Раздел 3.6 посвящён анализу вопроса о современном состоянии воспроизводства Волго-Каспийской популяции русского осетра на основании данных генетического мониторинга. Исследованы выборки морских и речных выловов сеголетков осетров, показано, что 71-76% особей могут быть однозначно приписаны к конкретным парам родителей. Генетический анализ подтвердил, что принятые меры по поддержанию генетического разнообразия на ОРЗ оказывают своё позитивное воздействие на популяционно-генетическую структуру русского осетра, и эти мероприятия нужно продолжать и в дальнейшем.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.

В этой главе автор на основе анализа полученных данных отмечает подтверждённый высокий уровень генетического полиморфизма русского осетра, а также обсуждает реконструкцию схемы происхождения видов комплекса *Acipenser gueleddaedtii* – *A. persicus* – *A. baerii*. Более раннее разделение между понто-каспийскими осетрами и сибирским и более позднее – между азово-черноморскими и каспийскими, и наконец – между каспийским русским осетром и персидским, достаточно хорошо обосновано. Результаты позволяют не только рассматривать ранее высказанные альтернативные филогенетические и филогеографические гипотезы и делать выбор в пользу одной из них, но и прояснять существенные дополнительные детали процессов видообразования в рассматриваемой таксономической группе. Обсуждается также вывод о значительном, если не решающем, вкладе искусственного разведения на ОРЗ в поддержание генофонда русского осетра и необходимости продолжения как исследований, в том числе мониторинга генетической структуры вида, так и самих маточно-ремонтных стад.

ВЫВОДЫ. Все выводы соответствуют целям и задачам работы, чётко сформулированы, основаны на полученных данных и их анализе.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ. Полученные данные имеют несомненную фундаментальную ценность, поскольку впервые детально изучен генофонд одного из наиболее ценных и в то же время находящихся в критическом состоянии (CR - под угрозой исчезновения) в природе вида осетровых рыб. Кроме того, в практическом

плане результаты диссертационной работы справедливо могут расцениваться как основа для инвентаризации и дальнейшего мониторинга состояния ремонтно-маточных стал русского осетра.

Несмотря на общий высокий научный уровень работы, можно сделать замечания, которые не принципиальны и носят частный характер:

С. 5 – «Цитохрома-с-оксидазы» - вероятно, имелось в виду «цитохрома b»?

С. 7. «Для оценки генетического полиморфизма маточных стад волжских осетровых рыбоводных заводов и оценке их вклада в поддержание численности волжско-каспийской популяции русского осетра впервые был применен масштабный подход генетического мониторинга взрослых производителей ОРЗ и молоди, собранной в речной и морской экспедициях.». Скажем, заложены основы мониторинга в будущем. Но поскольку никаких прямых сравнений выборок во времени не проводилось, называть эти исследования мониторингом несколько преждевременно.

С.7 – Неудачное выражение в задаче 6 – «вклад... в численность».

Глава 1. Обзор литературы.

Авторами видового описания русского осетра (см., напр. Богуцкая и Насека, 2004; электронные ресурсы fishbase.org или Eschmeyer's Catalog of Fishes) является не один Brandt 1933, но Brandt & Ratzeburg, 1833 (соответствующая ссылка Brandt, J. F. and J. T. C. Ratzeburg 1833 Medizinische Zoologie, oder getreue Darstellung und Beschreibung der Thiere, die in der Arzneimittellehre in Betracht kommen, in systematischer Folge herausgegeben. A. Hirschwald, Berlin. v. 2). В литературе встречаются оба варианта, но всё же лучше было или это хотя бы обсудить, или ссылаться на более точный из них.

С. 11 – Едва ли систему Расса и Линдберга без оговорок можно признать общепринятой «в настоящее время».

С. 14. В разделе 1.4 рассматривается система осетровых («среди осетровых...»), однако обсуждается и веслонос, который относится к другому семейству Осетрообразных – Polyodontidae.

С. 23 – В конце абз. 2 в названии курина осетра, видимо, пропущено «*kurensis*».

Удивительно и огорчительно отсутствие в списке рассмотренных источников немногих публикаций, непосредственно относящихся к теме диссертации, например: Водолажский Д. И., Корниенко И. В., Войнова Н. В. Гипервариабельность региона D-петли митохондриальной ДНК русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* (Acipenseriformes, Acipenseridae) // Вопросы ихтиологии. 2008. Т. 48, № 2. С. 266-275; Базелюк Н.Н., Козлова Н.В., Мухамедова Р.М. Молекулярно-генетическая идентификация русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) из естественных популяций Волжско-Каспийского бассейна // Естественные науки. 2013. № 2 (43). С. 82-86.

С. 26 - неудачное выражение – «нижние диапазоны температур», лучше «более низкие (значения) температуры».

Глава 2.

Раздел 2.1 – Сбор материалов. Не указано явно, какие именно образцы происходят из коллекции РНКЭГМ (ВНИРО), а не собраны в ходе самого диссертационного исследования. Если у них есть индивидуальные идентификационные номера (с.32, абз.1), то почему они не приведены в работе. Много образцов упомянуто в разделах глав 2 и 3, и для них нет соответствующего описания с привязкой к местам и датам лова, коллекторам и референсным номерам. Пример – табл. 2.4.

Рис. 2.2 – это рисунок автора, или взят из отчёта о рейсе (тогда нужно было дать ссылку)?

При анализе морфологии (**раздел 2.2**) следовало бы указать, какого размера рыбы анализировались. По крайней мере для пластических признаков качество морфометрии напрямую зависит от учёта аллометрии! Вообще при изучении подписи

к рис. 3.9 встаёт вопрос – а как именно формировались исходные группы осетров, как проводили идентификацию? Если по диагностическим признакам, то почему в результате всё же наблюдалось такое перекрытие облаков рассеяния PCA? Анализировались ли отдельно по морфометрии и генетике «аутлаеры» - особи, попавшие не в «свою» часть скаттерплота?

Относительно PCA есть и вопрос более общего свойства – если действительно применялся метод ординации в виде, как он обозначен в списке сокращений – метод главных координат (метрическое многомерное шкалирование через анализ матрицы дистанций), то это не то же самое, что метод главных компонент (использующий матрицу ковариаций или, в более современном варианте - сингулярное разложение – SVD – Singular Value Decomposition). Кстати, анализ главных координат стандартно сокращается как PCoA, а не PCA.

Раздел 2.4 – Не указан анализируемый фрагмент мтДНК для анализа митотипов, это был тоже контрольный регион? Эта информация появляется позже, только на с. 56.

Разделы 2.7, 2.8. Здесь и во многих других разделах работы анализ выборок молоди назван «мониторингом». С этим трудно согласиться, поскольку разовый скрининг с целью оценки каких-то параметров мониторингом не является – нет сравнительного анализа выборок во времени. Хотя это и создаёт предпосылки для мониторинга при повторном анализе с чёткой постановкой задач и при контроле условий отбора образцов.

Глава 3. Раздел 3.1. Один из выводов касается высокого, сравнимого с природными популяциями, уровня изменчивости, причём основан этот вывод на «отсутствии смещений частот между заводами и между полами». На мой взгляд, необходимо пояснить, почему это наблюдение имеет отношение к сравнению с природными популяциями, есть ли какие-то реперные значения показателей полиморфизма, на которые автор опирается. Вообще этот раздел в отношении анализа мтДНК иллюстрирован более скупо, чем остальные части главы 3. Нет медианной сети гаплотипов, вообще никаких иллюстраций.

Раздел 3.4. При анализе морфометрии использован критерий Стьюдента, но нигде не упомянуто, проводилась ли проверка на нормальность распределений значений признаков.

В разделе не хватает рисунка, который бы иллюстрировал сопряжённую изменчивость молекулярных и морфометрических данных на одном и том же материале.

Раздел 3.5. С. 75-76 и табл. 3.8 – Рассчитаны частоты чего? В данном случае реконструированных программой *Structure* исходных кластеров.

Рис. 3.11 - каким методом и по каким дистанциям строилась дендрограмма («кладограмма дистанций»).

Сокращения.

Список сокращений лучше (удобнее для читателя) было дать в начале диссертации, а не в конце.

С. 48-49. «ммоль/литр» - литр стандартно сокращается до «л».

Стиль и терминология.

С. 37. – Лабораторный жаргонизм «стоковый».

С. 43. – «частоты таких локусов» - должно быть «частоты аллелей таких локусов».

С. 49. «Для полученных электрофореграмм по 10 тетрасомным SNP локусам были

вычислены дозэффекты и составлена таблица частот для каждой выборки.» - частот чего? Аллелей, генотипов?..

С.64. «Подсчитывали количество двух рядов боковых жучек и двух рядов брюшных жучек...» Количество двух рядов - всегда ДВА! Подсчитывали, видимо, количество жучек в двух рядах.

С. 66. «...не работает для процента особей...» следовало бы сформулировать – «не работает для определённого процента (доли) особей..».

С. 71 Рис. 3.6. – «Коэффициенты PCA» - Мне не удалось найти ни в одном пособии по PCA определения «коэффициента PCA».

Замеченные **опечатки**:

С. 35 «Man-Whitney» и С. 66 «Ман-Уитни» вместо правильного «Манна – Уитни» или “Mann – Whitney”.

С. 76. Provesti's distance – опечатка, правильно Prevosti.

Таблица Б1 Приложения Б. в последнем столбце вместо «персидский» написано многократно «персидкий».

По оформлению:

В стандартных химических формулах нужно использовать нижние индексы, напр., С. 49 – « $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgCl_2 » - должно быть « $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgCl_2 .».

На рис. 3.8 или в подписи к нему можно было бы отметить, на какие диагностические признаки двух видов осетров нужно обратить внимание при рассматривании их голов снизу.

В **списке литературы** нет единого выверенного формата ссылок. Например, номер журнала то указан после знака «№», то в скобках после тома. Том обозначен то заглавной Т., то строчной (ссылка 110). После названия журнала стоит, как правило, точка, но иногда запятая (ссылка 133), или нет даже пробела (ссылка 134). Дефисы между годом и томом то присутствуют (ссылка 117), то отсутствуют. То же в отношении дефиса между томом и номером или страницами (ср. ссылки 124 и 125, например). Нет выделения курсивом родовых и видовых названий таксонов латыни. В ссылках 23 и 24, а также 44 и 45 непонятно, зачем стоят буквы «а» и «б» после имени автора, они также стоят и (как общепринято) после года публикации 1957. В ссылках 4-6 буквы стоят после имени автора и не стоят после года (как опять же общепринято). В текстовых ссылках есть отдельные случаи употребления соединительных союзов «и» или «and» между двумя авторами публикаций (напр., С. 15, 23, 24). Неправильно процитирована в тексте на С. 23 ссылка 46 - должно быть не «Глухов, 2000», а «Глухов, Скосырский, 2000». На С. 22 есть две ссылки на

Митрофанов, 1986 и Митрофанов и др., 1986, в списке литературы им соответствует одна ссылка 76 (с соавторами). Ссылка 54 – «Уч. зап. ЛГУ, 311, сер. биол. - Вып. 311.1962» - если 311 это «вып.», то что тогда ещё одно «311» после названия издания? Ссылка 113. «Научи,» вместо «Научн.».

С.76. «Prevosti, Ocafia, and Alonso, 1975» – должно быть «Prevosti et al., 1975».

Для публикаций в некоторых изданиях, явно представляющих собой сборники (напр. Ссылка 55 «Казанский Б.Н. Закономерности гаметогенеза и экологическая пластичность размножения рыб // Экологическая пластичность половых циклов и размножения рыб. 1975. С. 3-32.) не указано ни место издания, ни издательство, ни имя редактора. В ссылке 63 название публикации с. 27-33 «Разработка биологических основ и биотехники развития осетрового хозяйства в водоемах СССР» точно совпадает с названием всей книги в ссылке 62 (??). Ссылки 164 и 165 вообще идентичны, за исключением года публикации.

Во всём тексте диссертации и в списке литературы есть многочисленные нарушения правил сортировки ссылок, по крайней мере они не единообразны ни в пределах групп ссылок по тексту, ни в списке цитированной литературы.

Данные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работы.

Таким образом, можно заключить, что работа выполнена на актуальную тему, на репрезентативном материале и на высоком научно-методическом уровне, обеспечивающем достоверность результатов, выводы хорошо обоснованы. Диссертация имеет логичную структуру, написана грамотным научным языком, аккуратно оформлена, содержит наглядные иллюстрации. Материалы диссертации апробированы на научных конференциях разного уровня, в том числе международных: «Evolution-2014» в Роли, С. Каролина (США); XIV и XVI Европейских ихтиологических конгрессах в Льеже (Бельгия) и Лозанне (Швейцария). Результаты исследования представлены в восьми публикациях, в том числе в трёх статьях в журналах из списка ВАК (Molecular Ecology, Animal Genetics и F1000Research).

Диссертационная работа Сергеева А.А. является самостоятельным завершённым научно-квалификационным исследованием, имеющим несомненное практическое и теоретическое значение. Диссертационная работа соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842, и отвечает всем требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Сергеев Алексей Алексеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика.

Политов Дмитрий Владиславович,
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией популяционной генетики им. акад. Ю.П. Алтухова
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3
Тел. 8 (499) 135-50-67, email: dmitri_p(at)inbox.ru, dmitri.p17(at)gmail.com

03 марта 2020 г.

Подпись доктора биологических наук
Политова Дмитрия Владиславовича заверяю:
Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,
доктор биологических наук,

03 марта 2020 г.

Абилев Серикбай Каримович

