

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Осина А.Г. на диссертацию Радченко Ольги Аркадьевны «Систематика и филогения бельдюговидных рыб подотряда Zoarcoidei (Pisces, Perciformes)», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика

Актуальность темы диссертации.

Актуальность темы диссертации Радченко О.А. объясняется недостаточной изученностью этой одной из наиболее многочисленных по видовому разнообразию групп рыб, большая часть которого сосредоточена в бассейне Тихого океана. Филогенетические связи и современная систематика, в значительной степени, базирующиеся на данных морфологического анализа, являются предметом дискуссии. В значительной мере это может быть связано с тем, что установить гомологию многих морфологических признаков, которые используются систематиками, сложно, более того, есть данные в пользу конвергентного или параллельного возникновения некоторых признаков у разных таксонов. Одним из возможных решений этой проблемы является использование молекулярных данных, что и сделал автор. Для филогенетического анализа были использованы последовательности митохондриальной (гены COI, цитохрома b, 16S рРНК) и ядерной (гены RNF213, RAG1, родопсина) ДНК общей длиной в 4705 пар нуклеотидов. Для анализа филогенетических и систематических отношений автором изучено 106 видов из 8 семейств, 10 подсемейств и 57 родов. В некоторых случаях для филогенетического анализа вместе с молекулярными данными были использованы и морфологические признаки. Проведенный Радченко О.А. филогенетический анализ действительно способствовал уточнению многих спорных вопросов, касающихся филогении и систематики этой группы рыб.

Структура и содержание диссертации, её завершенность.

Диссертация состоит из введения, 9 глав, заключения, выводов, списка литературы и двух приложений. Работа изложена на 435 страницах печатного текста, содержит 62 таблицы в основном тексте и 20 в приложении, иллюстрирована 38 рисунками в тексте и 26 в приложении. Список литературы включает 358 работы, из них 230 на английском языке.

Введение диссертации четко показывает актуальность исследования, формулирует цели и задачи исследования, указывает научную новизну, практическую значимость работы

и те положения, которые выносятся на защиту. Раздел «Апробация работы» показывает, что материалы диссертационной работы докладывались в разнообразных профессиональных аудиториях. Автор указывает, что его личное участие в выполнении данного исследования составило не менее 80%.

В главе 1 дан подробный обзор данных о подотряде бельдюговидных рыб *Zoarcoidei*, который предположительно включает 9 семейств и 400 видов. Отмечено, что до сих пор продолжается описание новых видов, более 80 описано за последние 10 лет. Приводятся данные по биологии и распространению представителей основных таксонов этого подотряда. Подчеркивается, что взгляды разных авторов на филогенетические и систематические отношения представителей этого подотряда различаются. Существующая система этого подотряда в значительной мере опирается на данные анализа по морфологическим признакам. Отмечается, что существуют свидетельства в пользу конвергентного или параллельного возникновения некоторых из этих признаков у разных таксонов.

В главе 2 приводятся основные сведения о том, что представляют собой молекулярные данные, как они могут быть использованы для филогенетического анализа, какие методы построения деревьев (дистанционные, максимального правдоподобия, максимальной экономии, байесовы) существуют. Автором правильно подчеркиваются основные проблемы, которые могут отрицательно влиять на качество филогенетического анализа по молекулярным данным и как их тестировать.

В главе 3 приводятся основные данные об использованном автором биологическом материале, дается описание основных методик выделения ДНК, получение ПЦР продуктов и секвенирования фрагментов 6 генов. Приводится описание методов филогенетического анализа их основных параметров.

В главе 4 приводятся данные по анализу изменчивости трех генов мтДНК и трех ядерных. Фрагменты трех митохондриальных генов были секвенированы у 342 рыб, из которых ядерные гены были секвенированы у 291 (RNF213), у 230 (родопсин) и у 108 (RAG1) рыб. Подробно описываются все замены в исследованных генах и аминокислотные замены и ними связанные. Уровень изменчивости и число филогенетически информативных сайтов максимально у двух митохондриальных генов (CO1, *cyt-b*). Тем не менее, данные по всем 6 генам несут достаточно большой массив информации, что важно для проведения филогенетического анализа. Проведен анализ подверженности исследованных генов отбору и показано, что все они находятся под действием отрицательного отбора. Данные теста на селективность во всех случаях значимы ($P < 0.05$). То, что гены находятся под действием отрицательного, а не положительного отбора хорошо, который часто ведет к искажению филогенетических отношений между некоторыми таксонами.

В главе 5 приводятся данные по филогении и систематике 4-х подсемейств семейства Zoarcidae. В подсемействе Lycodinae подтвержден родовой статус для *Petroschmidtia*, который вместе *Lycenchelys* располагаются у основания дерева Lycodinae. Подтверждена монофилия всех родов этого подсемейства, включая группу родов Bothrocara. По мтДНК данным род *Lycenchelys* является полифитическим таксоном, однако для окончательного вывода необходимы данные по ядерным генам, так как нельзя исключать возможную интрогрессию мтДНК в прошлом. Подтверждена монофилия подсемейства Zoarcinae и рода *Zoarces*. Внутри рода *Zoarces* наиболее обособлен *Z. americanus*, а недавно описанный *Z. fedorovi* филогенетически близок к *Z. viviparus*. В подсемействе Gymnelinae выявлено две основные клады, первая включает группу родов *Hadropareia*, *Magadanichthys*, *Bilabria*, *Davidijordania*, а вторая рода *Krusensterniella* и *Gymnelopsis*. У основания дерева Zoarcidae располагается клада подсемейства Gymnelinae. Далее следуют, Zoarcinae, Lycozoarcinae и Lycodinae.

В главе 6 приводятся данные по молекулярной филогении и систематике семейства Stichaeidae. Эта наиболее спорная с точки зрения филогении и систематики группа рыб, а её монофилия остается под вопросом (Нельсон, 2009). Согласно данным Радченко, в современном понимании это семейство, а также подсемейство Stichaeinae полифилитичны. Так подсемейства Opisthocentrinae и Lumpeninae должны быть выведены из состава этого семейства. В рамках семейства должны остаться Stichaeinae, Xiphisterinae, Aletriinae и Chirolophinae. В подсемействе Stichaeinae выделяются группы видов, одна из которых тяготеет к Aletriinae и Chirolophinae, а две другие – к Xiphisterinae. Положение некоторых таксонов на филогенетических деревьях, построенных по мтДНК и яДНК данным, различно, что указывает на желательность привлечения новых данных, для уточнения филогенетических отношений таксонов этой группы.

В главе 7 приводятся данные по молекулярной филогении и систематике семейства Pholidae. В анализ включены данные по мтДНК генам (COI, цитохром b, 16S рРНК) 22 экземпляров от 6 видов из 4 родов и ядерным генам (RNF213, родопсин) 16 экземпляров от 4 видов из 4 родов. У основания дерева Pholidae располагаются рода *Xerperes* и *Apodichthys*, далее следует клада из двух видов *Rhodymenichthys* и за ней идет клада видов рода *Pholis*. По мнению автора, в семействе Pholidae нужно выделить два подсемейства и Pholinae и Apodichthyinae, исключив из состава последнего род *Xerperes*, положение которого на дереве бельдюговых рыб еще нужно определить. Почему автор приходит к таким выводам не совсем ясно.

В главе 8 обсуждается система подотряда Zoarcoidei, полученная по молекулярным данным, и её соответствие системе, основанной на морфологических данных. На основании положения *Neozoarces pulcher* из подсемейства Neozoarcinae на филогенетических деревьях, где он располагается между представителями семейства Anarhichadidae с одной стороны и Eulophiinae с другой, предлагается вывести это подсемейство из состава семейства Zoarcidae и

рассматривать его в ранге нового семейства Neozoarcidae. Полученные данные отвергают отнесение Neozoarcinae к семейству Stichaeidae, как это предполагали многие авторы на основании морфологического анализа. Подсемейство Eulophiinae, представленное в анализе двумя видами из родов *Leptostichaeus* и *Azygopterus*, предлагается рассматривать в ранге семейства Eulophiidae. Предлагается разделить подсемейство Xiphisterinae на два подсемейства: - Xiphisterinae с родами *Xiphister* и *Phytichthys*, которое остается в семействе Stichaeidae и Cebidichthyinae с родами *Cebidichthys*, *Dictyosoma*, *Esselenichthys* и *Nivchia*, которое из него выходит и его ранг повышается до семейства. Так, единственный его представитель (*Dictyosoma burgeri*), который был проанализирован по всем 6 генам, расположился в базальной части дерева Zoarcoidei. Судя по положению двух видов, представляющих семейства Cryptacanthodidae и Zaproridae, на филогенетических деревьях, они, скорее всего, являются сестринскими таксонами. Базальное положение на дереве Zoarcoidei занимают представители семейства Bathymasteridae, что согласуется с морфологической системой, и Cebidichthyidae. В целом, автор отмечает существенные различия между предполагаемыми филогенетическими и таксономическими связями между разными представителями подотряда Zoarcoidei, которые следуют из данных анализа по молекулярным и морфологическим данным.

В главе 9 автор приводит оценки молекулярных датировок для основных узлов на дереве Zoarcoidei и обсуждает возможные пути расселения представителей этого подотряда. Автором была использована программа BEAST, которая в рамках байесова анализа выдает оценки времени дивергенции таксонов с 95% доверительным интервалом. Согласно полученным оценкам, дивергенция внутри подотряда началась в конце олигоцена – начале миоцена, около 22 млн. лет назад. Первым отделился предок семейства Bathymasteridae (14.7-22.5 млн. лет), затем – Cebidichthyidae (13.1-19.1 млн. лет). Остальные семейства разошлись 10-15 млн. лет назад. Диверсификация подотряда на родовом и видовом уровнях началась в позднем миоцене, около 10.3-11.5 млн. лет назад. Центр происхождения бельдюговидных рыб находился в бассейне Тихого океана, откуда в миоцене началось распространение их в Южное полушарие. Предполагается, что проникновение бельдюговидных рыб в Атлантику сначала пролегал через Панамский перешеек, а после открытия Берингова пролива и через него.

В Заключении коротко обсуждаются полученные молекулярные данные, основные результаты, резюмируются основные расхождения между современной системой бельдюговидных рыб, которая опирается на данные морфологического анализа, и той, которую предлагает автор на основании полученных им данных.

Выводы соответствуют полученным автором результатам. Диссертация написана четким языком, читается легко, хорошо иллюстрирована и представляет собой законченное научное исследование.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование подотряда Zoarcoidei с обширным охватом таксонов (8 семейств, 10 подсемейств, 57 родов и 106 видов) и привлечением большого массива молекулярных данных (по трем митохондриальным и трем ядерным генам, общей длиной около 4705 пар нуклеотидов), что позволило решить многие вопросы филогении этой группы рыб. Для решения задач, связанных с уточнением состава и статуса некоторых таксонов, впервые использован комплексный подход, включающий анализ молекулярных и морфологических признаков. Все результаты, полученные автором, являются новыми. Большинство полученных результатов, касающихся филогенетических взаимоотношений, в первую очередь тех, где анализ проводился по 5-6 митохондриальным и ядерным генам, достоверны. Рекомендации автора по внесению изменений в систематику бельдюговидных рыб хорошо обоснованы материалом, которым он располагал. Понятно, что с включением в молекулярно-генетический анализ новых видов, а их порядка 300, возможны новые открытия, которые изменят наши представления по поводу филогении отдельных таксонов и потребуют внесения изменений в систематику этой сложной и разнообразной группы рыб.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Результаты, полученные автором, имеют важное значение для решения фундаментальной задачи по изучению существующего биоразнообразия, его данные существенно меняют наши представления о филогении и систематике подотряда Zoarcoidei. Это важно и в практической плоскости, так как Zoarcoidei одна из наиболее многочисленных по числу видов группа морских рыб. Предложенный автором набор из трех митохондриальных и трех ядерных генов показал, что он несет хороший филогенетический сигнал, и может быть использован для дальнейшего углубленного анализа эволюции бельдюговидных рыб, а также последующего анализа эволюции отдельных морфологических признаков. Полученные данные по молекулярной систематике и филогении подотряда Zoarcoidei могут быть использованы в специальных курсах высшего образования и полезны для подготовки специалистов – биологов.

Опубликование результатов в научной печати.

По теме диссертации опубликованы 43 научные работы, в том числе 25 статей в рецензируемых журналах, и включают все основные результаты данного исследования.

Содержание автореферата.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Замечания и комментарии к диссертационной работе.

Диссертация Радченко О.А. выполнена на высоком методическом уровне, однако, в ней есть и некоторые недостатки. Во-первых, в нескольких случаях недостаточно полно изложена методика конкретного анализа, его основные параметры, отмечены те или иные данные. Например, для проверки соответствия топологий филогенетических ML (метод максимального правдоподобия) деревьев, построенных по митохондриальным и ядерным генам отдельно с одной стороны и по объединенным данным, с другой стороны, автор приводит результаты 6 статистических тестов (табл.31), но не приводит самих топологий (рисунков с деревьями). Остается непонятным ни то, какие таксоны были включены в анализ, ни какие топологии были получены. Поэтому, хотя данные табл.31 однозначны, но не совсем понятны. Далее, автор достаточно подробно описывает основные параметры (модели), которые были использованы им при анализе молекулярных датировок с помощью пакета программ BEAST, но назвав три калибровочные точки, он не указал, ни где они располагаются на полученном им байесовом дереве, ни какое распределение было для них использовано. А это важно, так как от них зависят получаемые оценки молекулярных датировок. Не совсем понятно, почему автор везде пишет, что дивергенция внутри подотряда бельдюговидных рыб началась в конце олигоцена – начале миоцена. Полученная им датировка 18.4 (95%CI 22.5, 14.7) согласно международной стратиграфической системы 2014 г. попадает внутрь миоцена (23, 5.3) Излишне много места в диссертации занимает обсуждение данных по дивергенции нуклеотидных последовательностей, рассчитанных как отношение числа различающихся сайтов к их общему числу (p- distance). Например, на с. 326 автор пишет, что «величины генетических дистанций свидетельствуют о необоснованности включения рода *Rhodymenichthys* в синонимию рода *Pholis*. Показана генетическая и морфологическая близость этих родов и их обособление от родов *Apodichthys* и *Xerperes* ». Вообще- то любая генетическая дистанция оценивает только уровень генетической дивергенции между особями или таксонами, причем p- дистанция адекватна только при относительно низких значениях дивергенции (не более 5-7%). О филогенетических связях между таксонами в первую очередь судят по их положению на филогенетическом дереве. На дереве рода *Rhodymenichthys* и *Pholis* являются сестринскими таксонами, но вопрос о том нужно ли их рассматривать в рамках одного или двух родов, может решаться по-разному, в зависимости от набора критериев, которыми пользуется конкретный исследователь. К сожалению, автор диссертации не обсуждает проблемы современной систематики

(существуют разные школы) и не приводит собственные критерии, которыми он пользовался при определении объема и ранга отдельных таксонов. На мой взгляд, данные автора по анализу филогенетических отношений между разными представителями бельдюговидных рыб имеют более важное значение, чем некоторые предложения по внесению изменений в систематику этой группы. Скорее всего, часть из этих изменений, впоследствии будет подтверждена, а часть пересмотрена. На сегодняшний день диссертационная работа Радченко О.А. является наиболее полной по числу проанализированных видов, представляющих основные таксоны Zoarcoidei, и филогенетические связи для большинства из них определены надежно (высокие оценки бутстреп-поддержки и апостериорной вероятности для большинства клад). Тем не менее, учитывая данные других авторов (Kwan, Kim, 2013; Betancur-R et al., 2013), для уточнения взаимоотношений между некоторыми крупными таксонами этого подотряда возможно потребуется увеличить массив молекулярных данных, чтобы увеличить силу филогенетического сигнала и получить надежную топологию филогенетического дерева.

Заключение.

Диссертационная работа Радченко Ольги Аркадьевны «Систематика и филогения бельдюговидных рыб подотряда Zoarcoidei (Pisces, Perciformes)» является законченным научным исследованием, имеющим научно-практическое значение для дальнейшего изучения филогении и уточнения систематики этой большой и пока недостаточно изученной группы рыб, нашего понимания того, как эволюция и расселение рыб связаны с глобальными изменениями среды. Диссертация полностью соответствует требованиям пунктов 9-14 Постановления Правительства РФ №842 «О порядке присуждения ученых степеней» и её автор Радченко Ольга Аркадьевна заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика.

Ведущий научный сотрудник
кафедры ихтиологии
доктор биологических наук
(специальность 03.02.06- ихтиология)

Осинов Александр Георгиевич

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, биологический факультет, г. Москва 119991, Ленинские горы д. 1 строение 12, тел. (495) 939-40-92, E-mail: a-osinoy@yandex.ru.

