

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
имени А.В. Жирмунского
Российской академии наук
академик РАН А.В. Адрианов
« 4 » декабря 2015 г.

Ведущей организации Федерального Государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук (ИБМ ДВО РАН) о диссертационной работе РАДЧЕНКО Ольги Аркадьевны «СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНИЯ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ ПОДОТРЯДА ZOARCOIDEI (PISCES, PERCIFORMES)», представленной к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.06 - ихтиология и 03.02.07 – генетика.

Актуальность. Диссертация посвящена важной в теоретическом и практическом отношении проблеме – сравнительному изучению систематики и молекулярной филогенетики бельдюговидных рыб, *Zoarcoidei*. Научная значимость обусловлена тем, что представленное исследование ориентировано на решение одной из фундаментальных научных проблем – изучение биологического разнообразия и является важным вкладом в систему знаний о биологическом разнообразии рыб. Работа выполнена на объемном материале, включающем представителей основных семейств и подсемейств изученного подотряда. Происхождение основных таксономических групп подотряда территориально связывают с северной частью Тихого океана, с их последующим расселением в другие моря и океаны Северного и Южного полушарий, в которых возникли вторичные центры видообразования. Однако систематика этой группы все еще находится в стадии разработки и требует новых подходов, которые автор и представляет в своей диссертации.

Научная новизна и достоверность результатов. Работа построена по традиционной схеме, она изложена на 435 страницах машинописного текста (с двумя приложениями), включает 62 таблицы основного текста и 20 таблиц приложения А, иллюстрирована 38 основными рисунками и 26 рисунками, входящими в приложение Б. Диссертация состоит из введения, девяти глав, заключения, выводов, списка литературы, содержащего 363 источника, и двух приложений, А и Б. В диссертации поставлены и решены семь задач.

Автором получены новые для науки результаты, которые сформулированы в соответствующих разделах диссертационной работы и автореферата и представлены в открытой печати. По теме диссертации опубликованы 43 научные работы, в том числе 25 статей в рецензируемых журналах. В качестве обобщения предложена новая система подотряда Zoarcoidei, основанная на молекулярно-генетических данных. Она включает 14 семейств, в том числе новые Neozoarcidae, Eulophiidae, Lumpenidae, Opisthocentridae, Cebidichthyidae.

Глава I. Подотряд бельдюговидных рыб Zoarcoidei. В первой главе рассматриваются основные аспекты систематики и филогении бельдюговидных рыб, Zoarcoidei. Содержится описание биологии и распространения рыб семейств изученного таксона. Здесь же рассмотрены существующие системы подотряда бельдюговидных рыб Zoarcoidei и входящих в него семейств.

Глава II. Молекулярно-генетический подход к решению проблем систематики и филогении. В этой главе обосновывается молекулярно-генетический подход и его преимущества при исследовании систематики и филогенетических отношений живых организмов. Рассматриваются главные этапы молекулярно-филогенетического анализа, а также возникающие трудности и возможные погрешности применения молекулярных маркеров для реконструкции филогении.

Глава III. Материалы и методы. В третьей главе представлены основные материалы и методы, используемые автором для получения результатов диссертационной работы. Представлены данные об использованном биологическом материале по рыбам подотряда Zoarcoidei, обитающим в северо-западной части Тихого океана, в Охотском, Японском и Беринговом морях, а также в северо-восточной Пацифике и северной Атлантике. Для сравнительного молекулярно-генетического анализа привлечены данные из GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Объем материала составил 390 экземпляров рыб, представляющих 106 видов из 8 семейств подотряда. В качестве внешних групп использованы разные виды: *Trachurus trachurus* (Perciformes, Percoidei) и *Eleginops maclovinus* (Perciformes, Notothenioidei).

Анализ изменчивости ДНК проведен с использованием генов митохондриальной ДНК (мтДНК): цитохромоксидазы I (COI), цитохрома b и субъединицы 16S рРНК, а также генов ядерной ДНК (ядДНК): RNF213, родопсина и RAG1. Маркеры мтДНК и яДНК анализировались как отдельно, так и в комплексе, в одном массиве данных. Для определения сопоставимости наборов данных по мтДНК и яДНК и возможности их использования в филогенетическом анализе в виде объединенных последовательностей ДНК проведено сравнение альтернативных топологий филогенетических деревьев с

помощью различных статистических тестов: Winning sites (WS), Kishino-Hasegawa (KH), Shimodaira-Hasegawa (SH), на основе пакета программ PAUP 4.0b10.

Глава IV. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров бельдюговидных рыб подотряда Zoarcoidei. В главе приведены результаты сравнительного анализа изменчивости изученных фрагментов генов COI, цитохрома b, 16S рРНК митохондриального генома, а также RNF213, родопсина и RAG1 яДНК, определен их вклад в формирование генетической дивергенции бельдюговидных рыб. Размер нуклеотидной последовательности изученного фрагмента мтДНК составляет 2047 пн, яДНК – 2658 пн. Большая часть нуклеотидных последовательностей перечисленных участков генов зарегистрирована и размещена в базе данных GenBank с соответствующими номерами доступа (таблица А.1).

Глава включает три раздела: 1. Анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов митохондриальной ДНК; 2. Анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей генов ядерной ДНК; 3. Сравнение параметров изменчивости молекулярных маркеров.

Глава V. Молекулярная систематика и родственные отношения в семействе Zoarcidae. В этой главе для каждого из 3 подсемейств бельдюговых рыб и семейства Zoarcidae представлены данные об изменчивости нуклеотидных последовательностей фрагментов генов мтДНК: COI, цитохрома b и 16S рРНК (225 экземпляров 38 видов из 17 родов), а также генов яДНК: RNF213, родопсина (120 экземпляров 36 видов из 16 родов) и RAG1 (50 экземпляров 29 видов из 14 родов). Консенсусные филогенетические деревья получены на основе независимого анализа генов мтДНК (рисунки Б.1, Б.3, Б.5, Б.7, рисунок 9), яДНК (рисунки Б.2, Б.4, Б.6, Б.8), комбинированного анализа (рисунки 10, 17, 18, 22), объединяющего последовательности митохондриальных и ядерных генов, а также комплексного молекулярно-генетического и морфологического анализа (рисунки 11, 14, 16, 21, 23).

Глава VI. Молекулярная систематика и родственные отношения в семействе Stichaeidae. В данной главе приведены результаты анализа изменчивости последовательностей генов мтДНК: COI, цитохрома b, 16S рРНК и генов яДНК: RNF213, родопсина (78 экземпляров 31 вида из 22 родов), а также ядерного гена RAG1 (41 экземпляр 28 видов из 18 родов, принадлежащих к 6-7 подсемействам стихеевых рыб) семейства Stichaeidae. В таблицах 44, 45, 46, 53, А.10, А.13, А.16 даны значения *p*-расстояний между комбинированными последовательностями генов мтДНК и яДНК аксонов семейства, в таблицах 43, 47, 50, 52, А.11, А.12, А.14, А.16 – отдельно по генам

мтДНК и яДНК. На рисунках Б.9, Б.11, Б.13, Б.15, Б.17 приведены филогенетические деревья, полученные по данным независимого анализа генов мтДНК, на рисунках Б.10, Б.12, Б.14, Б.16, Б.18 – по яДНК, на рисунках 24, 25, 26, 27, 30 – по комбинированным данным. На основе молекулярно-филогенетического анализа определены степени дивергенции и родственные взаимоотношения на уровне видов, родов и подсемейств, реконструированы системы подсемейств и всего семейства Stichaeidae. Обсуждается соответствие молекулярно-филогенетических и морфологических схем родственных отношений стихеевых рыб. Глава состоит из 7 разделов, в соответствии с представленными материалами по 6 подсемействам и семейству в целом. Сделано заключение, что в филограммах для всего таксона в основании генных деревьев находится представитель семейства Bathymasteridae, наиболее примитивного в подотряде Zoarcoidei (рисунок 2 диссертации).

Глава VII. Молекулярная систематика и родственные отношения в семействе Pholidae. В главе 7 приведен анализ изменчивости последовательностей генов мтДНК: COI, цитохрома b, 16S рРНК (22 экземпляра 6 видов из 4 родов), а также генов яДНК: RNF213 и родопсина (16 экземпляров 4 видов из 4 родов семейства Pholidae). С помощью сравнительных оценок *p*-расстояний и топологий филограмм определены степени дивергенции и родственные взаимоотношения в семействе на уровне видов и родов. На основе молекулярно-филогенетического анализа реконструирована система семейства Pholidae. Обсуждается сходимость результатов, полученных молекулярно-филогенетическими и сравнительно-морфологическими методами. Материал сгруппирован с два раздела.

Глава VIII. Система подотряда Zoarcoidei по молекулярно-генетическим данным и оценка ее конгруэнтности морфологическим системам. Автор констатирует во вводной части, что молекулярная систематика подотряда Zoarcoidei практически не разработана. «Для изучения родственных связей и филогенетических построений крупных таксонов истинных костистых рыб Euteleostei привлекались лишь единичные нуклеотидные последовательности ДНК видов некоторых семейств – Zoarcidae, Stichaeidae, Pholidae и Bathymasteridae (Chen et al., 2003; Dettaï A., Lecointre, 2004, 2005; Kawahara, 2008; Li et al., 2008, 2009; Miya et al., 2003; Smith, Craig, 2007; Smith, Wheeler, 2004; Stankovic, 2005; Stepien et al., 1997). ... Лишь в работе Степьяна с соавторами (Stepien et al., 1997) на основе анализа гена 12S рРНК митохондриальной ДНК показаны филогенетические отношения между тремя главными семействами подотряда Zoarcoidei –

отмечено большее генетическое сходство между Zoarcidae и Stichaeidae (сестринские таксоны) и базальное положение к ним Pholidae».

Завершая анализ, автор констатирует: «Обобщенно схему родственных связей бельдюговидных рыб можно описать следующим образом. Наиболее близки к общему гипотетическому предку семейства Bathymasteridae и Cebidichthyidae – самые древние в подотряде. Таксоны семейства Zoarcidae образуют монофилетическую группу, которая занимает внешнюю, продвинутую позицию; первым в кластере отделяется подсемейство Gymnelinae, следом – подсемейство Zoarcinae, и в последнюю очередь – Lycozoarcinae и Lycodinae. Сестринские связи с этой группой характерны для семейств Anarhichadidae, Neozoarcidae и Eulophiidae. Все вместе они формируют отдельный макрокластер. Семейство Stichaeidae представляет полифилетическую группу, его подсемейства объединяются с другими семействами подотряда».

Всего в главе 7 разделов, в последнем из которых рассмотрено соответствие молекулярно-филогенетических и традиционных (морфологических) реконструкций родственных отношений в подотряде Zoarcoidei. Автор констатирует, что «...филогения, полученная молекулярно-генетическими методами, в значительной степени отличается от схем, основанных на сравнительно-морфологическом анализе таксонов бельдюговидных рыб». ... Но «определенное совпадение молекулярно-генетической и морфологической реконструкций системы бельдюговидных рыб существует. Она заключается в положении примитивного семейства Bathymasteridae у основания дерева (Anderson, 1994); в эволюционной древности и близости семейства Cebidichthyidae к общему гипотетическому предку (Макушок, 1958, 1961 а); в приблизительно одинаковых генетических расстояниях от предкового ствола подотряда до всех семейств, кроме Bathymasteridae и Cebidichthyidae (Anderson, 1994)».

Глава IX. Временные рамки дивергенции ДНК таксонов подотряда Zoarcoidei. В главе 9 проведена оценка времени дивергенции таксонов подотряда Zoarcoidei на основе молекулярно-филогенетических данных. Анализ объединенных последовательностей генов мтДНК и яДНК 61 представителя бельдюговидных рыб проведен с помощью пакета программ BEAST 1.7 (Drummond et al., 2012). Обсуждается сопоставимость оценок времени эволюции подотряда Zoarcoidei, полученных с использованием палеонтологической калибровки и концепции «молекулярных часов», а также их соответствие истории геологического развития зон и морей Пацифики, Арктики, Атлантики и данным биогеографии рыб этих акваторий. Рассмотрены предполагаемые пути расселения бельдюговидных рыб из тихоокеанского центра эволюции.

Из сводной информации (например, рисунок 38) автор заключает, что «Диверсификация центральных линий бельдюговидных рыб на родовом и видовом уровнях началась в начале позднего миоцена, около 10.3-11.5 млн. лет назад (узлы 56 и 52) – в подсемействах *Alectriinae* и *Stichaeinae* семейства *Stichaeidae*. Пик этого процесса, когда формировалось основное видовое разнообразие подотряда, пришелся на период позднего миоцена – плиоцена, 3.6 (узел 18) – 7.8 (узел 53) млн. лет назад. Судя по молекулярно-генетическим данным, скорее всего, этот период можно считать временем появления и расселения современных видов».

Диссертация заканчивается Заключением, в котором автором предлагается новая система подотряда *Zoarcoidei*, реконструированная по результатам анализа изменчивости генов мтДНК и яДНК.

Диссертация написана грамотным с профессиональной точки зрения языком, хотя все же имеются некоторые огрехи в грамматике и стиле, заметные даже в цитированных выше фразах из работы. Автореферат отражает основное содержание диссертации. Цель и задачи поставлены корректно. Выводы обоснованы фактическими данными и соответствуют поставленным задачам. Автор тщательно относится к работе с рукописью и анализу материалов. Большинство из замечаний, сделанных по первому варианту рукописи, были учтены. В результате текст диссертации читается без особых затруднений, хотя насыщен сложными терминами и различными вариантами анализа, пространством обсуждением и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить некоторые недостатки работы. Так, в главе III Материалы и методы (с. 76) указано, что для реконструкции генных деревьев использовали модели нуклеотидных замен, оцененные по Информационному критерию Акайке (AIC). Однако не пояснено, почему выбран именно этот подход из нескольких, и с помощью какого метода это обосновано.

При реконструкции генных деревьев для бельдюговидных рыб, кроме указанного недостатка, недостаточно полно представлена обширная литература по данному вопросу. В частности, остались не замеченными данные по молекулярной филогенетике бельдюговидных рыб, опубликованные в Журнале Генетика (Туранов и др., 2012) и Mitochondrial DNA (Turanov et al., 2014), процитирован лишь автореферат диссертации (Туранов, 2013).

Не смотря на представление совместного анализа молекулярных маркеров и морфологических признаков, не построено консенсусное видовое дерево, с учетом обоих типов признаков.

Как отмечено, большинство из сделанных ранее замечаний по рукописи были учтены. Однако, например, замечание о том, что термин «дистанции» является калькой с английского “distance”, а на русском языке принято употребление термина – расстояние (Корочкин и др., 1977; Картавцев, 2005, 2009), учтено лишь частично. В результате теперь в работе употребляются оба термина (с. 202 диссертации и далее), вызывая недоумение.

Остались вопросы к качеству выполненного анализа по молекулярному полиморфизму. Это относится, в частности, к обоснованности суждений об участии естественного отбора в молекулярном полиморфизме, в зависимости от позиции нуклеотида в кодоне. Ущербностью таких данных, при их огромном обилии в литературе, является слабая робастность таких оценок. Данные должны быть хорошо эндомозированы и иметь повторяемость для надежного исключения неучтенных при анализе факторов.

Как в любой большой работе, имеются недочеты по оформлению. В частности, не проведена дробная нумерация таблиц и рисунков, в соответствии с расположением по главам, что создает неудобства при чтении рукописи. Не нашел рецензент объяснения и расположения (Интернет-адреса) генного банка GenBank (NCBI). Не обнаружено также прямого обозначения аббревиатуры ПЦР.

Значимость результатов. Актуальность работы отмечена выше. Значимость проведенных исследований трудно переоценить. Автор проделал огромную работу, сосредоточив анализ на бельдюговидных рыбах. Внесен весомый вклад в фундаментальные знания и сделаны серьезные заделы для прикладных областей биологии и рыбного хозяйства.

Заключение. Диссертация Радченко О.А. «СИСТЕМАТИКА И ФИЛОГЕНИЯ БЕЛЬДЮГОВИДНЫХ РЫБ ПОДОТРЯДА ZOARCOIDEI (PISCES, PERCIFORMES)» является самостоятельным, оригинальным научным исследованием, затрагивающим фундаментальные научные проблемы и применимость полученных данных к практическим нуждам общества, в частности в прикладных разделах систематики и промысла рыб. По актуальности, научной новизне и практической значимости работа соответствует основным квалификационным критериям пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», отвечает требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Радченко Ольга Александровна, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.06 - ихтиология и 03.02.07 – генетика.

Отзыв подготовлен заведующим Лабораторией молекулярной систематики, доктором биологических наук, профессором Ю.Ф. Картавцевым и утвержден на Семинаре по популяционной биологии и генетике при ИБМ ДВО РАН. На семинаре присутствовало 14 человек. Поддержано: за – 14, против – 0, воздержавшихся – 0. Протокол семинара № 5 от 4 декабря 2015 г. Адрес ИБМ ДВО РАН: 690041 Владивосток, ул. Пальчевского 17, тел.: +7-4232-310905, эл. адрес: yuri.kartavtsev48@hotmail.com.

04.12.2015

Заведующий Лабораторией молекулярной систематики,
д.б.н., профессор

Председатель Семинара по популяционной биол
д.б.н., профессор

Ю.Ф. Картавцев
и ИБМ ДВО РАН

Ю.Ф. Картавцев

подп
Зав
Буре