

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБВВ РАН, д.б.н., профессор

А.В. Крылов

« 08 » сентября 2020 г.



О Т З Ы В

ведущей организации на диссертацию Сергеева Алексея Алексеевича на тему **«ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ РУССКОГО ОСЕТРА *ACIPENSER GUELLENSTAEDTII* BRANDT, 1833»** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика

Актуальность выполненной работы.

Актуальность представленной к защите диссертационной работы А.А. Сергеева не вызывает сомнений. Русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*) – ценный объект аквакультуры, численность которого во многом поддерживается за счет мер, предпринимаемых человеком по сохранению его природных запасов: создания осетровых рыбоводных заводов, регулирования сроков, объемов и акваторий вылова. При этом важно, что все представители отряда Осетрообразные, в том числе и русский осетр, являются редкими и включены в список видов Приложения II СИТЕС. Очевидно, что для эффективного ведения осетрового хозяйства без ущерба разнообразию этой группы необходимы знания о популяционной структуре, генетических особенностях, филогенетических связях как природных популяций русского осетра, так и разводимых в условиях заводов.

Кроме того, представленные в работе данные, несомненно, актуальны для решения проблем идентификации особей разных видов осетровых и продукции из них в связи с необходимостью контроля за сбытом этой продукции и борьбой с нелегальным промыслом.

Достоверность и научная новизна результатов исследования

Работа А.А. Сергеева выполнена с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа на выборках объемом более чем достаточным для решения поставленных задач. Сбор материала на осетровых заводах проводился в течение 14 лет, что исключает вероятность получения случайных, зависящих от условий конкретного года, результатов и отражает реальное состояние популяционно-генетической структуры рассматриваемого вида в заводских условиях. Кроме того, о достоверности результатов свидетельствует и тот факт, что разными методами, с применением разных генетических маркеров автор получает результаты, подтверждающие друг друга. Подробно описано проведение молекулярно-генетических работ, что делает их хорошо воспроизводимыми. Анализ морфологических особенностей разных популяционных группировок русского осетра Каспийского моря также выполнен на выборках, достаточных по объему. Для анализа полученных результатов автором используются корректные статистические тесты и программы. Таким образом, объем проанализированного материала и адекватность использованных методов не позволяют сомневаться в достоверности полученных А.А. Сергеевым данных.

Новым в работе, несомненно, является комплексный подход в исследовании осетра Каспийского моря, то есть анализ данных о генетическом полиморфизме с учетом информации о морфологии исследованных особей. Такой подход позволяет получить наиболее четкое представление о характере и уровне различий исследуемых популяций. Также, для лучшего понимания популяционной структуры осетров в работе использован ряд новых методик и молекулярно-генетических маркеров (AFLP, SNP), отработаны условия использования последних. Новым и интересным оказался опыт тестирования результатов экспресс-оценки принадлежности особей к группировкам персидского и русского осетра, которая применяется рыбаками и рыбводами в «полевых» условиях, методами генетического анализа.

Значимость полученных результатов для науки и практики.

Одной из задач диссертационной работы А.А. Сергеева является оценка уровня генетической дифференциации между русским и персидским осетрами. Автор пишет: «Таксономический статус персидского осетра многократно обсуждался и до сих пор вызывает дискуссии» (разд. 1.6., стр. 21). И это действительно так. Многочисленные исследования особенностей морфо-экологии, биохимии, кариологии, полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) и микросателлитных локусов, фингерпринтинга часто давали противоречащие друг другу результаты. Поэтому важное научное значение работы А.А. Сергеева в том, что с применением комплексного подхода в исследовании этой проблемы и новых информативных молекулярно-генетических маркеров однозначно была показана филогенетическая молодость персидского осетра и значительная его близость осетру русскому. Несомненно, эти данные должны стать основанием для систематиков при обсуждении таксономического статуса этой группы.

Кроме того, научный интерес представляют гипотезы о происхождении отдельных популяций русского осетра (азово-черноморской, северо-каспийской, южно-каспийской и др.). Эти данные могут быть использованы другими исследователями при рассмотрении филогеографии разных видов рыб понто-каспийского региона.

Выявление и тестирование А.А. Сергеевым новых информативных генетических маркеров имеет и практическое значение, в частности для решения задач охраны и воспроизводства осетровых рыб в рамках международной конвенции СИТЕС. Эти маркеры могут быть успешно использованы при разработке панели для идентификации видовой и даже популяционной принадлежности осетровых рыб и продукции из них, что, кроме того, позволит контролировать происхождение и качество последней. Также важным результатом диссертации для практики является оценка эффективности работы осетровых рыбоводных заводов (ОРЗ) на Волге. Полученные данные могут быть использованы руководством заводов для разработки мер ее повышения.

Оценка структуры и содержания диссертации.

Диссертационная работа Сергея Алексея Алексеевича состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и двух приложений. Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 27 рисунков. Список литературы включает 178 источников, из них 55 работ опубликованы в зарубежных изданиях.

Во **Введении** излагается актуальность и степень разработанности темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту. Показана теоретическая и практическая значимость работы и ее новизна, перечислены методы, применяемые автором в ходе выполнения исследования. Приведены сведения о личном вкладе соискателя, апробации работы, публикациях по теме диссертационной работы, освещена структура диссертации.

В главе 1 **«Обзор литературы»** приведен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Уделено внимание таким вопросам и проблемам как положение Осетрообразных в современной системе рыб, систематика и эволюционные отношения видов внутри отряда, генетические особенности осетровых рыб. Дана характеристика осетровых по уровням пloidности, подробно рассмотрены исследования популяционной структуры русского осетра. Проведен анализ имеющихся на данный момент результатов молекулярно-генетических исследований понто-каспийских осетровых. Освещена проблема таксономического статуса персидского осетра, рассмотрены мнения разных авторов по этому вопросу, начиная с первоописания данной группы рыб еще в конце 19-го столетия исследователем Н.А. Бородиным.

В целом, глава 1 показывает, что автором проанализирован большой объем литературы по теме диссертации. Обзор дает четкую и понятную картину современного состояния проблемы исследования и свидетельствует о значительной подготовке соискателя, что позволяет ему компетентно обсуждать собственные результаты. Анализ литературы выявляет

целесообразность использования ядерных ДНК-маркеров при изучении филогенетических взаимоотношений персидского и русского осетров, что и было, в том числе, сделано в рамках данной работы.

В главе 2 «**Материалы и методы**» автором описано, как и где проводился сбор образцов для молекулярно-генетического анализа и отлов рыб для изучения морфологии. Исследованием охвачены как волжские осетровые заводы (ОРЗ), так и участки основного судоходного канала дельты Волги ниже них, и часть Северного Каспия, что действительно позволяет делать выводы об эффективности работы ОРЗ. В целом, в рамках представленной работы разными молекулярно-генетическими и морфологическими методами проанализирован обширный материал. Важно отметить, что все собранные автором образцы тканей для генетического анализа занесены в базу данных и дополнили коллекцию РНКЭГМ ВНИРО. Также в этой главе автор подробно описывает проведение молекулярно-генетического анализа: выделение ДНК; тест на митотипы GUE, BAE, BL; AFLP и SNP методы; секвенирование контрольного региона мтДНК; микросателлитный анализ. Для обработки полученных результатов А.А. Сергеевым использованы адекватные приемы и программы (Statistica, GeneMarker, SeqMan, GenAlex, Structure, TFPGA и др.), которые позволяют корректно проанализировать полученные первичные данные. Следует отметить, что все эти программы широко применяются другими исследователями во всем мире.

В главе 3 «**Результаты**» на 38 страницах в сопровождении 19 рисунков и 10 таблиц изложены результаты исследований А.А. Сергеева. Автором показано, что для маточных стад русского осетра на всех исследованных осетровых заводах характерен высокий уровень генетического полиморфизма, при чем значительных различий между заводами выявлено не было. Эти данные подтверждают правильную организацию рыбоводной деятельности заводов, что позволяет избежать потери генетического разнообразия этой подлежащей охране группы рыб.

Проведенный автором анализ полиморфизма маркеров митохондриальной и ядерной ДНК (контрольный регион, микросателлиты, AFLP, SNP) позволил

прояснить популяционно-генетическую структуру русского осетра, включая и популяции азово-черноморского района. Согласно полученным А.А. Сергеевым данным можно выделить следующие популяционные группировки внутри вида *A. gueldenstaedtii*: популяции русского осетра Северного Каспия, Южного Каспия, азово-черноморского района и персидский осетр, при чем две последние группы являются наиболее молодыми и филогенетически близкими друг другу. Важно отметить, что исследования, проведенные автором, вносят наконец ясность в вопрос о филогенетических отношениях персидского осетра: показано, что эта группа очень близка русскому осетру.

Данные генетического анализа подтверждает и анализ морфологии этих групп. Автором показано, что персидский и русский осетры очень схожи по признакам внешней морфологии. Они значимо различаются друг от друга лишь по двум меристическим признакам – среднему числу спинных и боковых жучек, при чем хиатус по этим признакам отсутствует и выявлены многочисленные переходные формы между типичными для обеих групп вариантами. Этот вывод сделан не только на собственном материале, но с использованием данных из литературы, что свидетельствует о его достоверности.

Важный результат представленной диссертации – выявление и оценка ошибки идентификации персидского и русского осетров с использованием экспресс-определения принадлежности рыбы к той или иной группе, которое применяется рыбаками и рыбоведами в «полевых» условиях. Показано, что из-за близости персидского и русского осетров по морфологии экспресс-тест может давать неверные результаты идентификации до 15% случаев. Поэтому автор справедливо делает вывод о том, что, когда необходима точная идентификация особей, результаты морфологического анализа должны быть верифицированы с использованием молекулярно-генетических методов (тест на митотипы или использование панели SNP).

Следует также отметить еще один интересный и важный для практики результат работы А.А. Сергеева: с использованием информации о полиморфизме микросателлитных локусов автором проанализирована частота

встречаемости молоди и сеголеток с разных осетровых заводов в Волге и северной части Каспийского моря. Показано, что популяция русского осетра в Волго-Каспийском рыбохозяйственном бассейне до 70% пополняется за счет работы осетровых рыбоводных заводов.

В целом надо сказать, что описанные в этой главе результаты, несомненно, представляют теоретический интерес, позволяют более эффективно организовать мониторинг за состоянием популяций русского осетра и работы по поддержанию и разведению этого ценного вида.

В главе 4 «**Обсуждение результатов**» автор проводит анализ полученных данных и обсуждает возможные варианты формирования современного генетического полиморфизма русского осетра, в частности, используя паттерн частот VL митотипа в разных его популяциях. Кроме того, в этом разделе дается оценка роли осетровых заводов в поддержании численности и высокого уровня генетического разнообразия диких популяций вида.

В **Заключении** автор подводит итог проведенного им исследования и формулирует **Выводы** диссертационной работы. В **Приложениях А и Б** приводится информация об использованных в ходе работы праймерах для SNP локусов и дается характеристика успешности использования отдельных праймеров для идентификации персидского и русского осетров. Без сомнения, представленную в Приложениях информацию можно использовать при создании панели для идентификации разных популяционных группировок внутри рассматриваемого вида.

В целом, работа, проведённая автором, впечатляет: использован большой объём материала, видно, что сбор материала был проведен согласно определенной схеме, нацеленной на получение ответов на конкретные вопросы. Огромна работа автора по проведению молекулярно-генетического анализа, где в комплексе использованы одни из самых современных методов, проведена сложная предварительная работа по поиску информативных и эффективно работающих маркеров и подбору условий для их работы. Получен и корректно проанализирован большой объём информации о морфологическом и генетическом полиморфизме русского осетра.

Вместе с тем к диссертации имеется ряд замечаний.

1. В тексте диссертации автор нарушает правила оформления ссылок на литературные источники. Так, часто два автора перечисляются через союз «и», например, Субботкин и Субботкина, 2001 (стр. 23); Чугунов и Чугунова, 1964 (стр. 24); Dingerkus and Howell, 1976 (стр. 15) и т.д. Если публикация написана тремя авторами, то в тексте ссылка на такую работу должна быть приведена как Калмыков и др., 2009, а не «...Калмыков, Рубан, Павлов, 2009...» (стр. 4). На странице 23 дана ссылка «...Глухов, 2000...», но в списке литературы у этой публикации два автора– Глухов, Скосырский, 2000. В ссылке «..Митрофанов, 1986...» (стр. 22) очевидно пропущено указание на соавторов «и др.», поскольку в списке литературы публикации Митрофанова без соавторов нет. Отсутствует в списке литературы ссылка на работу Vasil'ev et. al., 2009, которая упоминается в тексте на странице 16: либо автор забыл указать ее в списке, либо имелась в виду работа Vasil'eva et. al., 2009, но в результате опечатки ссылка в тексте оказалась неверной. На странице 17 пропущена фамилия автора в ссылке: написано «...(1953; 1957а, б)...», должно быть (Гербильский, 1953; 1957 а,б). Очевидно, фамилию автора надо понимать из контекста работы.

В некоторых случаях нарушен порядок упоминания авторов в ссылках. Например, на странице 5 ссылка на работу Мюге и др., 2008 должна быть перед ссылкой Krieger et. al., 2008; на странице 15 ссылка Jenneckens et. al., 2001 должна предшествовать работе Ludwig et. al., 2001; и т.д.

2. Многие ссылки в списке литературы оформлены неаккуратно, инициалы авторов, выходные данные публикаций даются не в едином порядке. На работу Rodzen J.A., May В. дается две ссылки (номера их 164 и 165), при этом название публикаций, журнал, выходные данные, кроме года, одинаковые. Это разные публикации или продублирована одна и та же работа?

Нарушен алфавитный и хронологический порядок упоминания авторов в списке литературы. Место очень многих ссылок должно быть другим. Так, должны быть поменяны местами ссылки 16 и 17, не выверен порядок ссылок с 42 по 45 – сначала должны идти публикации с одним автором. При построении списка литературы в алфавитном порядке необходимо учитывать фамилии всех

авторов публикации (первого, второго, третьего и т.д.), что не сделано и порядок ссылок с 70 по 73 неверен. Необходимо поменять местами ссылки 91 и 92, 100 и 101; 125 и 124; 131 и 132; ссылка 118 должна быть перед ссылкой 116; ссылка 127 должна идти после 130, а ссылки со 150 по 153 должны идти перед ссылкой 148.

3. В работе есть грамматические ошибки, опечатки, неудачно построенные фразы и словосочетания. Например, везде в работе используется словосочетание «осетровые виды». Неудачно название раздела «История вопроса персидского осетра». На странице 5 читаем «..цитохром-с-оксидаза...» – вероятно имеется в виду цитохром b; неудачны также словосочетания «нерестовая структура» (стр. 2), «субвидовая структура» (стр. 16) и др. Не очень красиво смотрятся в тексте транслитерированные английские слова и аббревиатуры, например, бар-кодинг (стр. 5), снип (стр. 43). На странице 76 опечатка в названии дистанции «...Provesti's distance...», хотя исходя из фамилии первого автора, на чью работу далее дается ссылка, термин должен быть Prevosti's distance. В автореферате на странице 16 присутствует эта же опечатка. В подписи к рисунку 3.15 опечатка «...Черноеое море...».

4. У автора присутствует путаница с использованием названия отряда – Осетрообразные *Acipenseriformes* и семейства – Осетровые *Acipenseridae*. На странице 11 можно видеть «гибрид» этих терминов: автор пишет «...отряд *Acipenseriformes* (осетровые).....».

5. Автор неудачно разместил Список сокращений и условных обозначений в конце диссертации. Его лучше было бы дать перед основным текстом работы, так как уже на странице 6 в целях исследования без расшифровки дается сокращение «ОРЗ», что затрудняет понимание того, о чем идет речь.

6. Описывая структуру диссертации, автор пишет, что в работе 25 рисунков и 18 таблиц (стр. 10). Однако на самом деле в тексте работы 27 рисунков и 16 таблиц. Связана эта ошибка, очевидно, с тем, что в тексте присутствует путаница с упоминанием рисунков и таблиц. Например, на странице 82 дается ссылка на кладограмму на рисунке 3.8. Однако рисунок 3.8.

– это фотография голов русского и персидского осетров (стр. 68). На странице 89 в ходе обсуждения частот встречаемости молоди осетра с разных осетровых заводов в Волге и Каспийском море идет ссылка на рисунок 3.17; однако рисунок 3.17 – это диаграмма положения выборок осетра в пространстве Главных координат (стр. 86). Очевидно, автор имел в виду рисунок 3.19 на странице 90.

7. Следует обратить внимание на оформление рисунков и подрисуночных подписей: в подписи к рисунку 3.13 персидский осетр из Южного Каспия указан дважды – под цифрами 2 и 4, а на рисунке 3.3 очевидно наложение одной диаграммы на другую.

8. На странице 78 читаем: «...При сопоставлении графиков распределений южно-каспийских генотипов русских (синий цвет на Рисунке 3.9) и персидских осетров (красный цвет на Рисунке 3.12)...». Однако в подписи к рисунку 3.9. (стр. 70) синий цвет обозначает персидского осетра. Не ясно, то ли перепутаны номера рисунков и на самом деле имеется в виду тот же рисунок 3.12 вместо 3.9, или указание на рисунок правильное, но перепутан цвет.

9. В разделе 3.1 автор пишет, что «...Полученные данные подтверждают соответствие стад производителей, исследованных ОРЗ, по уровню генетического полиморфизма природной волжско-каспийской популяции русского осетра...» (стр. 54). Однако ни в тексте, ни на рисунках это читателю никак не показано.

10. Тест Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни имеют разные области применения. Первый критерий – параметрический, используется при работе с признаками, которые подчиняются закону нормального распределения. U-критерий Манна-Уитни – непараметрический критерий и используется при работе с признаками, которые не подчиняются закону нормального распределения. В данной работе можно было бы обойтись одним из этих критериев, исходя из характера распределения значений признаков. То, что оба критерия показали значимые различия, не влияет на степень достоверности

результата: вполне достаточно использовать один из них, соответствующий типу распределения.

11. Было бы очень хорошо, если бы автор продумал и привел в Материалах и методах общую таблицу с численностью материала, проанализированного разными методами и из разных точек сбора. Иначе приведенные в тексте цифры не очень понятны: сначала говорится о 1163 проанализированных методами молекулярно-генетического анализа образцах (стр. 32), затем о 197 особях, у которых также для генанализа были взяты фрагменты плавников (стр. 33), затем еще о 266 сеголетках, от которых взяты ткани для этого же анализа (стр. 34). Далее следует упоминание еще о 1047 особях, от которых не понятно – были ли взяты и обработаны пробы в рамках данного исследования, входят ли эти особи в состав 1163, упомянутых выше или нет. Ясно, что обработан большой объем материала, но какой конкретно?

12. В виде таблицы также можно было бы оформить данные об уровне генетического полиморфизма маточных стад осетровых заводов (стр. 53): когда эта информация приводится в тексте, как это сделал автор, она воспринимается намного труднее.

13. Почему таблицы в Приложениях обозначены А1 и Б1, когда их по одной в каждом приложении и можно было бы ограничиться обозначением А и Б? Возникает желание искать таблицы А2 и Б2.

В целом, однако, следует отметить, что указанные недочеты и ошибки не являются принципиальными и не могут повлиять на общую высокую положительную оценку диссертационной работы А.А. Сергеева.

Заключение

Таким образом, по актуальности темы исследования, достоверности полученных результатов, масштабности проведенной работы, теоретической и практической значимости, научной новизне, высокого методического уровня диссертация А.А. Сергеева «Популяционно-генетическая структура и филогенетические связи русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833» представляет собой завершенную научно-квалификационную работу. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, логичны, исходят из


полученных результатов, четко сформулированы. Автореферат отражает материалы диссертации, по оформлению и содержанию соответствует требованиям ВАК РФ. Публикации по теме диссертации отражают ее содержание и материал.

Диссертационная работа Алексея Алексеевича Сергеева отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям ВАК России в изложенном в п. 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.06 – ихтиология и 03.02.07 – генетика.

Отзыв на диссертацию А.А. Сергеева «Популяционно-генетическая структура и филогенетические связи русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt, 1833» обсужден и одобрен на расширенном заседании лаборатории экологии рыб ИБВВ РАН (протокол № 1 от 27.01.2020 г.).

Отзыв составлен старшим научным сотрудником лаборатории Экологии рыб ИБВВ РАН им. И.Д. Папанина Боровиковой Е.А.

Старший научный сотрудник
лаборатории Экологии рыб
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской академии наук (ИБВВ РАН),
кандидат биологических наук
(специальность 03.02.07 – Генетика)

 Боровикова Елена
Александровна

Адрес организации:
152742, Ярославская обл., Некоузский район, пос. Борок
Тел.: +7(920)6508050
e-mail: elena.ibiw@gmail.com

«28» сентября 2020 г.

