

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Александра Александровича Гандлина «Эволюция усачей рода *Barbus* Кавказа и сопредельных регионов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – зоология

Филогенетические взаимоотношения видов и пути их расселения в пределах существующих ареалов представляют собой одну из ключевых проблем современной эволюционной биологии. Чем сложнее поставленная задача, тем интереснее для ученого искать и находить пути ее решения, и, если рассматривать работу А.А. Гандлина с этих позиций, то, несомненно, и объект и регион исследования выбраны оптимально. Крымские и кавказские усачи относятся к многочисленной группе *Barbus sensu lato*, для ряда представителей которой, как известно, характерна повышенная скорость эволюции и видообразования, и взаимоотношения между видами внутри родов неоднозначны и зачастую противоречивы. Исследуемые в работе виды обитают в реках бассейнов Черного и Каспийского морей, в регионе с богатой и сложной геологической историей.

Актуальность данной работы, посвященной изучению филогении и филогеографии шести видов усачей рода *Barbus*, не вызывает сомнения. Этот род включает в себя 39 видов и считается наиболее изученной с точки зрения таксономии и генетики группой усачей. Исключение составляли только крымские и кавказские виды, и, забегая вперед, хотелось бы отметить, что соискатель в представленном исследовании успешно ликвидировал этой пробел.

Всего на территории Крымско-кавказского региона встречаются шесть видов усачей, три из которых – терский (*Barbus ciscaucasicus*), куринский (*B. cyri*) и севанский (*B. goktschaicus*) обитают в водоемах бассейна Каспийского моря, и три – крымский (*B. tauricus*), кубанский (*B. kubanicus*) и рионский (*B.*

rionicus) усачи населяют реки Азово-черноморского бассейна. Именно эти виды и стали объектами исследования. Таксономия рода *Barbus* в регионе неоднократно пересматривалась: некоторые из выделяемых сегодня видов ранее имели подвидовой статус; названия других видов менялись, иногда неоднократно. Это вполне закономерно: классификацию видов осуществляли на базе их морфологии, и это при том, что усачи в целом фенотипически пластичны. Помимо этого, для большинства усачей рода *Barbus* свойственна аллопатрия, и стабильные репродуктивные барьеры между видами в ряде случаев отсутствуют, вследствие чего возникновение физических контактов между ними может приводить к межвидовой гибридизации. Зафиксировать же случаи межвидовых скрещиваний, опираясь исключительно на морфологические подходы, не представляется возможным. Таким образом, существенный недостаток молекулярно-генетических данных не позволял до настоящего времени решить широких круг проблем, касающихся таксономии, филогеографии и эволюционной истории крымско-кавказских усачей.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность работы.

В ходе выполнения работы впервые определены последовательности трех фрагментов мтДНК и ядерного маркера Act-2 у всех шести видов усачей Кавказа и Крыма, а также у некоторых родственных им видов из Турции и Греции. Автором предложена филогенетическая структура рода *Barbus*: в пределах вида было выделено две клады – Западноевропейская и Центрально-Восточноевропейская, которая в свою очередь состоит из двух субклад – Балканской и Понто-Каспийской. Ядро последней составляют усачи Кавказа и Крыма. Показано, что кавказско-крымские усачи являются полифилетической группой и подразделяются на три подгруппы: черноморскую (*B. tauricus* и *B. rionicus*), каспийскую (*B. cyri* и *B. goktschaicus*) и северокавказскую (*B. ciscaucasicus* и *B. kubanicus*). Выявлены особенности филогеографии и популяционной структуры для каждого из

видов и предложены логичные объяснения обнаруженным фактам. Установлено, что генетические различия между куринским и севанским усачами находятся на межпопуляционном, а не на межвидовом уровне. Впервые выявлены случаи межвидовой гибридизации среди усачей в исследуемом регионе. Показано, что ареал терского усача простирается на более, чем 100 км южнее предполагаемого ранее.

Представленная работа вносит существенный **фундаментальный вклад** в понимание эволюционных процессов в ихтиофауне Кавказа и сопредельных регионов, систематики рода *Barbus* s. str., а также паттернов расселения усачей в пределах современного ареала. **С практической точки зрения** данное исследование имеет несомненное значение для сохранения биоразнообразия в этом регионе. Полученные последовательности депонированы в международную базу данных NCBI и могут быть использованы для идентификации видов усачей, в том числе при анализе средовой ДНК.

В ходе проведения исследования и написания работы автор проявил высокую компетентность, прекрасное знание литературы по данному вопросу и умение работать с ней. Экспериментальные методы и статистические подходы достаточно современны и актуальны. **Выводы соответствуют поставленным цели и задачам** и отражают содержание всей работы.

Объем диссертации составляет 191 страницу. Работа состоит из введения, шести глав, четыре из которых посвящены изложению собственных результатов, выводов, списка литературы и двух приложений. В работе процитировано 227 источников, в том числе 153 – на иностранных языках. Текст сопровождается 36 рисунками и 11 таблицами. Материалы диссертации отражены в **3 статьях в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК РФ** и индексируемых в базе Web of Science, а также в 4

публикациях в материалах научных конференций. **Автореферат соответствует тексту диссертации.**

Во «Введении» А.А. Гандлин предоставляет развернутую информацию об усачах, начиная с *Barbus sensu lato*. Поэтапно снижая уровень иерархии, автор приходит непосредственно к описанию объектов исследования и обозначению актуальности работы, формулировке целей и задач исследования, изложению научной новизны, теоретической и практической значимости работы и предлагает положения, выносимые на защиту. Сведения о личном вкладе указывают на то, что соискатель выполнял работу на всех ее этапах, начиная от сбора материала и заканчивая статистической обработкой и обобщением результатов. Результаты работы были доложены на 6 научных конференциях, тематика исследования поддержана грантами РНФ и РФФИ.

Глава 1 посвящена физико-географической характеристике Крыма и Кавказа и состоит из двух разделов, первый из которых посвящен Кавказу, а второй – Крыму. В начале разделов кратко, но при этом достаточно емко изложена геологическая история соответствующего региона, после чего приводится его физико-географическая характеристика. Здесь автор весьма подробно описывает рельеф, климат, речную сеть, и это представляется в высшей степени оправданным, поскольку создает предпосылки для понимания процессов, определяющих эволюционное развитие видов Крымско-Кавказского региона.

В **Главе 2** приведена характеристика исследованного материала, достаточно подробно описаны методы исследования и аргументированно обоснован их выбор. Производит впечатление большой объем проанализированного материала, в сборе которого автор принимал участие. Экспериментальная часть работы представляет собой стандартный молекулярно-генетический анализ, включающий в себя выделение ДНК, ПЦР и секвенирование фрагментов митохондриального и ядерного геномов.

В ходе статистической обработки данных А.А. Гандлин использовал широкий спектр подходов и самое актуальное программное обеспечение, что несомненно является еще одним достоинством работы. В случае крымских усачей дополнительно были проведены морфологические исследования, включающие в себя анализ меристических и пластических признаков.

Глава 3 посвящена изучению филогении рода *Barbus* s. str. и определению положения усачей Кавказа и Крыма внутри рода. В начале главы автор приводит информацию о ранее проводимых исследованиях в этом направлении, и более подробно возвращается к этому вопросу при обобщении результатов филогенетических построений в разделе 3.4. Основные выводы сделаны на основании результатов анализа фрагмента гена *cytb* длиной 993 п.н.; митохондриальный маркер COI использовался как вспомогательный и ожидаемо был менее информативен. В работе впервые предложена детальная филогенетическая организация рода *Barbus*. На филогенетическом дереве выделяются две основные клады – Западноевропейская, включающая в себя два вида, и Центрально-восточноевропейская, в свою очередь делящаяся на две субклады – Балканскую и Понто-Каспийскую. Именно в состав последней входят все виды усачей Крыма, Кавказа и Турции. На основании результатов филогенетического анализа автором предложена оригинальная гипотеза возникновения и расселения вида рода *Barbus* s. str. А.А. Гандлин предполагает, что центр возникновения данного рода находится на Балканах, и дальнейшее распространение вида происходило как в восточном, так и в западном направлении.

Глава 4 «Филогения усачей рода *Barbus* Понто-Каспийской субклады по данным мтДНК. Филогеография усачей Кавказа и Крыма» является наиболее объемной и информационно-насыщенной. В первой части главы автор рассматривает происхождение видов Понто-Каспийской субклады и анализирует филогенетические взаимоотношения внутри нее. Все усачи

Крыма и Кавказа разделяются на три подгруппы Черноморскую, Каспийскую и Северокавказскую; Черноморская подгруппа представлена наибольшим количеством видов.

В трех других разделах главы детально исследованы вопросы филогеографии каждой из групп в отдельности. Самой сложной по своей структуре оказалась Черноморская подгруппа: помимо крымского (*B. tauricus*) и рионского (*B. rionicus*) усачей в нее входят два европейских вида и турецкие усачи из бассейнов Черного и Мраморного морей. Показано, что современное распространение видов коррелирует с их генетической структурой. Наибольшее разнообразие выявлено у крымского усача: популяции из рек Крыма принадлежат к трем генетическим линиям, близким в том числе к усачу из бассейна Мраморного моря, а впервые обнаруженная популяция с Кубани – к черноморским видам турецких усачей. Полученные данные свидетельствуют о множественных волнах миграций в периоды пресноводных фаз в Черноморской котловине при заселении Крыма. Рионский усач, напротив, представляет собой значительно дивергировавший вид, не имеющий общих гаплотипов с другими линиями.

Результаты, полученные при анализе мтДНК усачей Каспийской группы, показали, что севанский (*B. goktschaicus*) усач отличается от куринаского (*B. cyri*) на уровне не видов, но популяций, что дает основания для пересмотра его таксономического статуса. Для куринаского усача дополнительно был проанализирован наиболее полиморфный участок мтДНК, контрольный регион, но и при этом его популяционная структура оказалась выражена существенно слабее, чем у черноморских видов. Автор объясняет это возможными миграциями рыб в другие реки через малосолёные воды Каспия.

В ходе исследования было подтверждено родство терского (*B. ciscaucasicus*) и кубанского (*B. kubanicus*) усачей, и эти два вида были выделены в Северокавказскую подгруппу. Для обоих видов характерно более

низкое генетическое разнообразие по сравнению с представителями других подгрупп, причем в большей степени это было отмечено для кубанского усача. Автор предлагает этому весьма закономерное объяснение, связанное с гляциальной историей Северного Кавказа. Следует отметить расширение ареала терского усача в южном направлении более, чем на 100 км, что было установлено на основании анализа генов митохондриальной и ядерной ДНК.

В **Главе 5** рассматривается полиморфизм усачей Кавказа и смежных регионов по ядерному маркеру Act-2. Использование данного маркера в работе позволило впервые выявить факты межвидовой гибридизации на Кавказе между представителями различных филогенетических подгрупп – кубанским и крымским усачами. При этом дивергенция видов по ядерному маркеру оказалась не столь выражена, как по митохондриальным, хотя практически все виды получилось идентифицировать. Автором разработан оригинальный методический подход, позволяющий определять аллели, находящиеся в гетерозиготном состоянии.

Фенотипические особенности усачей Крыма описаны в **Главе 6**. Исследования проводили, основываясь на анализе меристических и пластических признаков. Заметные отличия по менее подверженным влиянию окружающей среды счетным признакам были обнаружены в популяции р. Черная, которая принадлежит к отдельной митохондриальной линии. По пластическим признакам наибольшая дивергенция была обнаружена для популяции из экстремальной для жизни усачей р. Учан-Су. Автор отмечает перспективность данного подхода в исследованиях крымских усачей, поскольку даже анализ ограниченного по объему материала позволил получить осмысленный результат.

Диссертация Александра Александровича по праву заслуживает самой высокой оценки, но, тем не менее к работе имеется ряд **замечаний**, носящих преимущественно рекомендательный характер.

- 1) В Главе 1 автор приводит развернутую физико-географическую характеристику Кавказа и Крыма. Глава очень насыщена и читается с огромным интересом, однако представляется целесообразным добавить в текст иллюстративный материал – карты соответствующих регионов с обозначенными на них ключевыми для данной работы реками.
- 2) В диссертации отсутствует обзор литературы в классическом значении этого понятия. Вне всякого сомнения, вся необходимая для понимания проблемы и интерпретации результатов информация приведена во введении и в соответствующих главах с собственными данными. Тем не менее, объединение известной на момент проведения исследования информации, позволило бы составить более целостную картину.
- 3) Из главы «Материалы и методы исследования» следует, что не все полученные последовательности депонированы в базу данных NCBI. Автору рекомендуется в самое ближайшее время ликвидировать этот недочет.
- 4) В ихтиологической части работы (Глава 6) было бы полезно провести сравнительный морфологический анализ усачей из р. Чёрной Крыма (предполагаемый *B. oligolepis*) с усачами *B. oligolepis* из их типичного ареала вида в бассейне Мраморного моря.
- 5) На стр. 6 фразу «Терский усач известен из рек Северного и Восточного Кавказа...» можно было бы сформулировать более изящно.
- 6) На стр. 104 во фразе «лишь в нашей выборке этот вид представлен из 22 рек десяти речных бассейнов», очевидно, пропущено слово «особями».

В заключении считаю необходимым еще раз подчеркнуть, что замечания ни в коем случае не умаляют достоинств этой работы.

Диссертация Александра Александровича Гандлина соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного

Постановлением правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности **1.5.12 – зоология.**

Официальный оппонент

Зеленина Дарья Александровна

Кандидат биологических наук (03.00.03 – Молекулярная биология)

Ведущий научный сотрудник отдела молекулярной генетики

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

105187, г. Москва, Окружной проезд, 19; <http://www.vniro.ru/>

+7(903)550-10-06; d.zelenina@gmail.com

Подпись заверяю

Ученый секретарь

ФГБНУ «ВНИРО»



Смирнова / М. В. Смирнова

В диссертационный совет 24.1.034.01, при
Институте биологии внутренних вод
им. И. Д. Папанина РАН

Я, Зеленина Дарья Александровна, даю согласие выступить официальным оппонентом по диссертации Гандлина Александра Александровича на тему «Эволюция усачей рода *Barbus* Кавказа и сопредельных регионов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – зоология.

СВЕДЕНИЯ ОБ ОППОНЕНТЕ

1. ученая степень, ученое звание, отрасль науки и научная специальность, по которой защищена диссертация: кандидат биологических наук, биологические науки, 03.00.03 – молекулярная биология.
2. место работы (полное наименование организации): Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»
3. Сокращенное наименование организации: ФБГНУ ВНИРО.
4. Почтовый адрес организации с указанием индекса: 105187, г. Москва, Окружной проезд, 19
5. Адрес официального сайта в сети Интернет: <http://www.vniro.ru/>
6. Наименование структурного подразделения: отдел молекулярной генетики
7. Должность: ведущий научный сотрудник.
8. Телефон с указанием кода города: +7(903) 550-10-06.
9. Адрес электронной почты: d.zelenina@gmail.com
10. Список основных публикаций по профилю оппонируемой диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15):
 1. Зеленина, Д.А., Животовский, Л.А., Сошнина, В.А., Вилкова, О.Ю., Глубоковский, М.К. Внутривидовая дифференциация азиатской горбуши по данным о последовательности митохондриального гена *cytb* // Генетика. – 2022. – Т. 58. – № 11. – С. 1280-1291.
 2. Пильганчук, О.А., Муравская, У.О., Зеленина, Д.А. Исследование микросателлитной изменчивости нерки *Oncorhynchus nerka* (Walbaum, 1792) р. Большой // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. – 2022. – Т. 66. – С. 68-78.
 3. Косицына, А.И., Шпигальская, Н.Ю., Сергеев, А.А., Сошнина, В.А., Савенков, В.В., Денисенко, А.М., Муравская, У.О., Зеленина, Д.А. Генетическая идентификация молоди горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum) Охотоморского бассейна по результатам рестрикционного анализа митохондриальной ДНК и анализа однонуклеотидных полиморфизмов. Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. – 2022. – Т. 66. – С. 52-66.
 4. Gilbey, J., Soshnina, V.A., Volkov, A.A., Zelenina, D.A. Comparative genetic variability of pink salmon from different parts of their range: native Pacific, artificially introduced White Sea and naturally invasive Atlantic Scottish rivers // Journal of Fish Biology. – 2022. – V. 100 (2) . – P. 549-560.

5. Quintela, M., Bhat, S., Præbel, K., Gordeeva, N., Seljestad, G.W., Hanebrekke, T., Mateos-Rivera, A., Vikebø, F., Zelenina, D., Cheng, C.H.C., Johansen, T. Distinct genetic clustering in the weakly differentiated polar cod, *Boreogadus saida* Lepechin, 1774 from East Siberian Sea to Svalbard // Polar Biology. – 2021. – V. 44 (8). – P. 1711-1724.
6. Зеленина, Д. А., Сошнина, В. А., Сергеев, А. А. Филогеография и митохондриальный полиморфизм кижуча Азиатских стад // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – №. 6. – С. 997-1005.

Ведущий научный сотрудник
Отдела молекулярной генетики
ФГБНУ ВНИРО

Д.А. Зеленина

Подпись заверяю
Ученый секретарь
ФГБНУ "ВНИРО"



И. В. Ступка