

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Водясовой Екатерины Александровны «Внутривидовая дифференциация и филогеография европейского анчоуса (*Engraulis encrasicolus*)», представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.06. –

ИХТИОЛОГИЯ

Европейский анчоус относится к числу широко распространенных, массовых пелагических морских рыб, имеет большое промысловое значение и является важной составной частью трофических цепей в океанических водах. Обитая в условиях широкого диапазона колебаний температуры и солености, анчоус обнаруживает высокую пластичность морфологических характеристик, послужившую, в свое время, основой для описания целого ряда локальных видов и подвидов. Правомочность выделения двух таких подвидов – азовского и черноморского анчоусов – до сих пор дискутируется. По мере развития молекулярно-генетических методов были начаты исследования анчоусов Средиземного моря и Атлантики, приведшие к выявлению двух митохондриальных филогрупп, одна из которых была описана в статусе самостоятельного вида – *Engraulis albidus*. Однако анчоусы Черного и Азовского морей остались вне этих исследований.

Целью диссертационной работы Екатерины Александровны Водясовой было оценить внутривидовую изменчивость и дифференциацию локальных группировок анчоуса в Азово-Черноморском регионе и выяснить их филогенетические и таксономические отношения с анчоусами Средиземного моря и Атлантики. Следует еще раз подчеркнуть, что до исследований Е.А. Водясовой черноморско-азовские популяции анчоуса с применением молекулярно-генетических методов не изучались.

Для достижения сформулированной цели были поставлены следующие задачи: 1) изучить внутривидовую изменчивость и дифференциацию азовского и черноморского анчоуса на основе митохондриального гена *cytb* и микросателлитных локусов ядерной ДНК; 2) проанализировать морфологическую изменчивость азовского и черноморского анчоуса в контексте гидрологических условий их нереста; 3) сопоставив

морфологическую и генетическую изменчивость, дать оценку обоснованности выделения азовского и черноморского подвидов; 4) провести филогеографический анализ европейского анчоуса на всем ареале вида, реконструировать наиболее вероятную историю расселения вида в Азово-Черноморском бассейне и дать оценку филогенетических отношений азово-черноморского анчоуса и анчоуса Средиземного моря и Атлантики; 5) изучить распределение митохондриальных гаплогрупп анчоуса по ареалу в контексте влияния различных климатических факторов.

Представленная диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 151 странице, включает 17 таблиц и 35 рисунков. В списке литературы 240 работ, из них 91 на русском языке. Форма списка литературы вызывает вопрос к диссертанту: почему-то для публикаций с несколькими авторами сначала указывается один автор, а после названия работы – все авторы, в работах, с одним автором его фамилия приведена два раза.

Результаты проведенных исследований представлялись на 13 международных и всероссийских конференциях и совещаниях, опубликованы в 19 печатных работах, 6 из которых - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК.

Во **Введении** автором изложены представления об актуальности темы исследования, дана оценка степени ее разработанности, сформулированы цели и задачи работы, ее научная новизна, теоретическое и практическое значение, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, данные по публикациям, структуре и объему работы и благодарности научному руководителю и коллегам из различных организаций и учреждений, оказывавших автору помощь и содействие на разных этапах подготовки диссертационной работы.

Первая глава представляет собой обзор сведений из литературных источников. В ее первой части рассмотрены представления разных авторов о подвиде и сделано заключение о трех необходимых его характеристиках (условиях): наличие «наследственных закрепленных различий по нескольким

закрепленным признакам» (стр. 15), аллопатрический или парапатрический тип распространения и филогенетическая обособленность, допускающая поток генов между подвидами. Данное заключение представляется дискуссионным.

В специальном подразделе подробно рассмотрена история формирования представлений о степени различий между черноморским и азовским анчоусом; дана их биологическая характеристика, рассмотрены основные аргументы в пользу неправомочности выделения двух подвидов. Диссертантом дан критический обзор предшествующих публикаций, демонстрирующий перекрывание нерестового и зимовального ареалов черноморского и азовского анчоусов, диагностируемым разными авторами по разным основаниям, показано образование смешанных скоплений и неоднозначность идентификации отдельных локальных популяций. В результате сделан вывод об актуальности молекулярно-генетических исследований для проверки валидности двух подвидов. Стоит отметить, что диссертант здесь и в некоторых других частях работы (стр. 4, 21, 23) некорректно пользуется понятием «целесообразность», совершенно непригодным для таксономических заключений.

Второй раздел главы посвящен филогеографии европейского анчоуса. В этой части диссертант рассматривает различные публикации, посвященные некоторым биологическим особенностям вида, гипотезам о времени его проникновения и расселения в бассейнах Средиземного, Черного и Азовского морей, генетической изменчивости по ядерным и митохондриальным генам в Атлантике и Средиземноморье, двум митохондриальным линиям и их предполагаемому происхождению. Завершает главу обзор литературы по клинальной изменчивости митохондриальных генов у европейского анчоуса, в которых оценивается влияние разных экологических факторов на изменчивость митохондриального генома. Диссертант справедливо подчеркивает, что в подавляющем большинстве генетических исследований популяции черноморского-азовского анчоуса не представлены.

В **Главе 2** (Материалы и методы) представлен изученный материал и дано более или менее подробное описание использованных методов: измерения

параметров отолитов (было изучено 799 экз. из 21 выборки), филогенетического и популяционно-генетического анализа на основе изучения фрагмента митохондриального гена цитохрома b (данные получены от 84 экз. из 7 проб), микросателлитного анализа на основе 10 локусов (по данным от 288 экз. из 13 проб), анализа влияния факторов среды на распределение выявленных филогрупп, ГИС моделирования и методов статистического анализа данных.

В **Главе 3** приводятся полученные результаты. В первой части представлены результаты исследования внутривидовой структуры черноморско-азовского анчоуса на основе изучения отолитов. Показано, что длина и ширина отолита, а также определяемый на их основе индекс коррелируют со стандартной длиной тела рыбы. На основе полученной оценки суммарной погрешности определения индекса отолита сделан вывод о том, что величина индекса должна округляться до десятых значений, а не до сотых, как это было принято раньше. Показано, что в этом случае псевдосмешанные скопления могут принимать вид однородных. Выявлена отрицательная корреляция между индексом отолита и углом между рострумом и антерострумом (β), определяющим форму отолита. На основе дискриминантного анализа анчоусов, выловленных у берегов Крыма, по параметрам отолитов выявлены две наиболее различающиеся выборки из Керченского пролива, которые отнесены диссертантом к азовской и черноморской хамсе, обнаруживающим значительное перекрытие по индексу отолита, не позволяющее определять особей из области перекрытия. Показано, что при идентификации рыб по двум параметрам – индекс отолита и величина угла β – средняя ошибка составляет всего 3%. Полученные классифицирующие уравнения верифицировались диссертантом на материалах из музейной коллекции ЗИНа. На их основе проведено исследование скоплений анчоуса в Азовско-Черноморском регионе за 2010-2016 годы, показавшее, что большинство изученных скоплений являются смешанными, при этом на юге преобладает форма близкая к черноморскому анчоусу, а в Азовском море и в северо-западной части Черного моря – к азовскому.

В связи с проведенной оценкой соотношения черноморского и азовского анчоусов в пробах, представленной в табл. 9, следует отметить, что ряд оценок вызывает определенные сомнения. Так проба от мыса Тарханкут характеризуется большими значениями угла β , чем выборка из Керчи, для которой указано 100% азовского анчоуса, но для нее почему-то приводится только 74% азовской формы.

Следующий раздел главы представляет результаты изучения внутривидовой структуры по генетическим данным. На основе изменчивости гена *cut b* сделано заключение о генетической однородности азово-черноморского анчоуса, начало роста популяции датировано величиной около 128 тыс. лет назад. На основе данных по 7 микросателлитным локусам, оставленным для окончательного анализа, также не выявлено существенных различий между исследованными локалитетами; по результатам анализа методом главных компонент все пробы оказались полностью перемешанными.

Проведенное сравнение двух выборок черноморского и азовского анчоусов, сформированных на основе строения отолитов, также не выявило достоверных различий по микросателлитным локусам, что объясняется полученными высокими значениями количества мигрантов на поколение.

Таким образом, все проведенные генетические тесты показали генетическую однородность между и внутри косяков анчоуса из Азовского и Черного морей. Такая ситуация характерна для видов с большим эффективным размером популяций и высоким уровнем миграций. С помощью корреляционного анализа диссертантом выявлена слабая корреляция между величиной угла отолита и температурой и соленостью воды в местах обитания нерестовых групп.

К сожалению, в этой части работы не для всех видов анализа диссертант приводит достаточно поясняющей информации на рисунках (рис. 14, 16) и в тексте (отсутствуют и в главе 2), что затрудняет работу с диссертацией. Кроме этого, возникает вопрос к диссертанту в связи с анализом сформированных групп анчоуса, рассматриваемых в качестве представителей двух подвидов. Как указывает диссертант, подвидовая принадлежность особей в этих группах

определялась «с помощью морфологических методов» (стр. 82), т.е. на основе величин индекса отолита и угла β . Однако, как показывают данные на рисунке 22, по среднему индексу отолита эти группы не различаются, соответственно, можно полагать, что особей дифференцировали только на основе значений угла β , что и следовало указать. Сам рисунок 22 неудачен – средние значения можно было дать в тексте, а на рисунке лучше было показать распределения значений в обеих группах.

Во второй части главы 3 приведены результаты исследования изменчивости митохондриальной ДНК на всем ареале европейского анчоуса. Построенное филогенетическое дерево, включающее 102 сиквенса из Генбанка и 84 сиквенсов азово-черноморских анчоусов подтвердило наличие двух клад, выявленных в предыдущих исследованиях. Все пробы азово-черноморских анчоусов попали в одну из этих атлантико-средиземноморских клад. Показано, что гаплотипы, характерные для двух клад, отличаются по их распространению в бассейне восточной Атлантики. С помощью различных тестов выявлена зависимость между частотами гаплотипов двух клад и температурой и соленостью воды.

На основе данных по распределению гаплогрупп и данных о гидрологических условиях с помощью программы MaxEnt было проведено моделирование экологических ниш для двух митохондриальных линий анчоуса. Показано, что наибольшее влияние на распространение оказывают среднегодовые значения температуры и солености и их диапазон.

К сожалению, в этой части работы также имеются проблемы с оформлением. Рисунок 27 явно нуждается в поясняющей информации. Судя по тексту, на оси ординат даны географические точки, для которых определялось соотношение гаплотипов двух клад. Однако какие это точки – остается неизвестным, поскольку необходимая легенда отсутствует. По-видимому, нумерацию точек следовало нанести на рисунке 26. Нумерацию точек следовало нанести и на рис. 28, поскольку различия для точек 1-10 и 60-62 упоминаются в тексте диссертации. На рисунках 30 и 31 не указано: какой параметр представлен на оси ординат. Из текста диссертации осталось неясно:

какими двумя способами в модели рассчитывался вклад разных гидрологических факторов на распространение гаплогрупп.

Глава 4 «Обсуждение» состоит из трех частей. В первой части на основе полученных результатов и данных литературы обсуждается правомочность выделения подвидов анчоуса в черноморско-азовском бассейне. Диссертант делает совершенно обоснованное заключение о том, что так называемых азовского и черноморского анчоуса следует рассматривать как экологические формы, дифференциация которых по форме отолитов обусловлена различиями в гидрологическом режиме (прежде всего солености и температуры) мест нереста и, соответственно, раннего онтогенеза, разных стад.

К сожалению, следует отметить, что использование термина «подвид» для двух **морф**, очень неудачно для рассмотрения проблем генетической внутривидовой изменчивости, популяционной структуры и репродуктивной изоляции анчоуса и существенно осложняет диссертанту анализ собственных результатов и данных литературы. В результате приходится прибегать, в частности, к неудачному объяснению несовпадения результатов диссертанта по микросателлитным маркерам с данными Калниных (Калнин, Калнина, 1985) по аллозимам **потерей дифференциации** в результате постоянного потока генов (стр. 105), а также к явному противоречию в утверждениях о различных местах нереста азовского и черноморского анчоуса (по литературным данным) «и отсутствием пространственно обособленных репродуктивных, нагульных и зимовальных областей» (по результатам диссертанта) (стр. 106).

Второй раздел «Обсуждения» посвящен филогеографии европейского анчоуса. Диссертант обоснованно заключает, что анчоус заселил черноморско-азовский бассейн после открытия Босфора, однако следует отметить, что это событие датируется возрастом около 7.5-5 тыс. лет, а не 10 тыс. лет, как указывается в диссертации (стр. 111). В настоящее время, согласно полученным данным по изменчивости мтДНК и данным ихтиологических исследований, популяции анчоуса в Азовском и Черноморском морях находятся в состоянии экспансивного роста. Отсутствие дифференциации по митохондриальной ДНК между азово-черноморским анчоусом и атлантико-средиземноморской кладой

В, как и генетическая однородность линий А и В по всему ареалу связываются с активными миграциями вида.

В последнем разделе «Обсуждения» анализируется влияние климатических факторов на распределение митохондриальных линий в Азово-Черноморском бассейне. Диссертантом предложена модель, согласно которой более теплолюбивая и устойчивая при низкой солености филогенетическая линия А распространена по всему ареалу, а для линии В подходящие условия отмечаются в северной части Атлантики и Средиземного моря. Присутствие линии В в Черном море лишь у берегов Болгарии объясняется отрицательным отбором на стадиях икры под действием низкой солености.

«Заключение» представляет собой краткое тезисное изложение отдельных итогов обсуждения.

Завершают диссертационную работу Е.А. Водясовой 5 выводов, в целом соответствующих поставленным задачам. Следует, однако, заметить, что окончания 1-ого и 3-его выводов повторяются.

Результаты диссертационной работы Е.А. Водясовой являются новыми, получены лично диссертантом на основе использования методик, адекватных поставленным задачам и принятых в отечественных и международных исследованиях. Выдвинутые положения, обобщения и выводы базируются на репрезентативном материале, обоснованы, достоверны и в полной степени отражают полученные результаты. Статистическая обработка данных проведена с использованием общепринятых методов.

Выполненное Е.А. Водясовой исследование свидетельствует о неправомерности выделения подвигов черноморско-азовского анчоуса и объясняет наличие двух морф, дифференцируемых по форме отолитов, различиями в температуре и солености на локальных нерестилищах. Полученные результаты имеют теоретическое и большое практическое значение в связи с оценкой рыболовной нагрузки на единицы промысла.

На основе полученных результатов Е.А. Водясовой подготовлена серия работ в рецензируемых журналах и материалах тематических конференций,

отражающих основные результаты выполненного исследования. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Несмотря на высказанные замечания, следует подчеркнуть, что диссертационная работа Е.А. Водясовой «Внутривидовая дифференциация и филогеография европейского анчоуса (*Engraulis encrasicolus*)» представляет собой законченное исследование, выполненное на основе комплексного применения современных разносторонних методов и вносит существенный вклад в исследования анчоусов, относящихся к важнейшим объектам мирового рыбного промысла. Представленная работа полностью отвечает требованиям к кандидатским диссертациям и соответствует пп. 9-11, 13, 14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор – Водясова Екатерина Александровна – заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.06 – ихтиология.

Доктор биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник,
зав. сектором ихтиологии
Зоологического музея
Биологического ф-та
Московского гос. университета им. М.В.Ломоносова
Васильева Екатерина Денисовна
Москва 125009, Большая Никитская ул., 2
zmmu.msu.ru
e-mail: vas_katerina@mail.ru
Раб. тел.: 8-495-6294906

« 13 » апреля 2021 г.

Подпись Васильевой Екатерины Денисовны
заверяю