

ОТЗЫВ официального оппонента на диссертацию
**МЕЛЬНИКА НИКОЛАЯ ОЛЕГОВИЧА «Эндемичные гольцы (*Salvelinus*,
Salmonidae) бассейна реки Камчатка (морфология, экология, происхождение)»**,
Представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.13 – «ихтиология»

Работа Мельника Николая Олеговича посвящена актуальной проблеме эволюционной биологии – явлению адаптивной радиации. Адаптивная радиация лежит в основе всего того многообразия биоты, которое мы наблюдаем ежедневно, хотя пути ее формирования часто оказываются нам не известны и неясны. Вместе с тем, понимание механизмов становления биологического разнообразия позволит разрабатывать методы его охраны и поддержания, эффективно и без причинения урона управлять им, проводить мониторинг и прогнозировать изменения в состоянии биоты.

В представленной диссертационной работе автор как раз и ставит перед собой непростую задачу – выявить и понять причины наблюдаемого разнообразия форм гольца (*Salvelinus*, *Salmonidae*) бассейна р. Камчатка. Поскольку факторы, ведущие к диверсификации форм, могли быть любыми, автор постарался охватить в своем исследовании все возможные популяционные параметры и характеристики, что не может не впечатлять. Проведена грандиозная комплексная работа по исследованию как морфологии и экологии эндемичных форм гольца, так и генетического полиморфизма его популяций, филогении.

В результате работы автором получены новые данные о расположении нерестилищ каменного и белого гольцов в бассейне р. Камчатка; впервые проведено сравнение раннего развития мальмы и каменного гольца; описан ранее не известный для лососевых механизм экологической диверсификации, основанный на физиологической адаптации к повышенному содержанию естественных токсинов на нерестилищах; показана роль уровня тиреоидных гормонов в процессе адаптивной радиации гольцов. Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов не вызывает сомнений.

Исследование Н.О. Мельника выполнено с использованием как классических, так и современных методов изучения морфо-экологии рыб и молекулярно-генетического полиморфизма популяций. Автором успешно применены методы геометрической морфометрии, анализ соотношения стабильных изотопов азота в мышечной ткани рыб, микросателлитный анализ, секвенирование. Сбор материала проводился в течение нескольких лет в пределах всего бассейна р. Камчатка, что исключает вероятность получения случайных, зависимых от условий конкретного года, результатов и отражает реальное состояние популяционно-генетической структуры объекта исследования. Численность анализируемых выборок более чем достаточна для решения поставленных задач. Подробно описано проведение всех методов анализа, что делает их хорошо воспроизводимыми. Для анализа полученных результатов автором используются корректные статистические тесты и программы. Ценными являются результаты экспериментальных работ по влиянию уровня тиреоидных гормонов на развитие разных форм гольцов. Это еще более повышает валидность результатов, так как подтверждает гипотезу автора, которая была сформулирована после проведения натурных исследований. Таким образом, объем проанализированного материала и адекватность использованных методов не позволяют сомневаться в достоверности полученных диссертантом данных.

Диссертационная работа Мельника Николая Олеговича состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 15 таблиц и 23 рисунка. Список литературы включает 450 источников, из них 347 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, приведены сведения о личном вкладе соискателя, степени достоверности и апробации работы на конференциях разного уровня, дана информация о публикациях автора по теме диссертационной работы, освещена структура диссертации. Кроме того, Введение содержит информацию о финансовой поддержке проводимых исследований и благодарности научному руководителю и коллегам из разных учреждений и организаций, кто оказывал автору содействие и помощь в ходе подготовки диссертационной работы.

В главе 1 **Обзор литературы** приведен анализ большого числа отечественных и зарубежных литературных источников по теме диссертации. Глава написана детально; содержит три подраздела, посвященных филогении гольцов рода *Salvelinus*, а также рассмотрению примеров адаптивной радиации в озерах (для гольцов) и в реках (для других групп рыб). Уделено внимание таким вопросам и проблемам, как сложность филогении и филогеографии рода *Salvelinus*, что ведет к различным таксономическим системам, часть из которых неоднозначна и дискуссионна. Интерес представляет обсуждение трех направлений диверсификации гольцов в озерах: высказанные идеи могут быть применены и при рассмотрении адаптивной радиации других групп озерных рыб. Для речных экосистем также обсуждается ряд факторов, способствующих радиации и диверсификации форм, хотя, как отмечает автор, эти данные ограничены результатами исследований рыб тропических водотоков. На основе проанализированной информации соискатель делает предположение о возможности наличия примеров диверсификации гольцов в реках.

Замечания к 1-й главе. На страницах 18–19 автор размышляет о сходстве экологической диверсификации в разных, в том числе филогенетически удаленных, группах животных, что он связывает со сходством экологических ниш этих групп. Это совершенно справедливо и не вызывает вопросов. Однако далее в качестве примера приводятся особенности экспрессии генов кальциевого обмена, определяющих форму головы, для цикловых рыб и выюрковых птиц. На мой взгляд этот пример здесь не совсем корректен, так как о каком сходстве экологических ниш рыб и птиц мы можем говорить? Совершенно очевидно, что здесь проявляются иные закономерности работы генома.

И еще один вопрос касается примеров адаптивной радиации рыб в реках. Автор подробно обсуждает примеры разнообразия тропических видов рыб. А известны ли автору рыбы, обитающие в реках умеренных и арктических широт северного полушария, для которых также описаны разные экологические формы (стада)? Думаю, что о них стоило бы упомянуть в тексте диссертации.

В главе 2 **Материалы и методы** автор описывает район работ, методики отбора проб и подход к классификации гольцов на анализируемые группы – каменный голец, мальма и белый голец. Следует отметить тщательность сбора проб и широту охвата исследуемого бассейна: для сбора материала был предпринят даже сплав по реке. Соискателем были применены разные методы для анализа особенностей морфо-экологии, молекулярно-генетического полиморфизма, пространственного распределения разных форм гольцов. В главе подробно освещены использованные методы биологического анализа, анализа

питания, включая изотопный анализ мышечной ткани, методы оценки возраста и паразитологического анализа, методы анализа особенностей морфологии и краниологии с применением геометрической морфометрии, методы анализа полиморфизма Д-петли митохондриальной ДНК (мтДНК) и изменчивости микросателлитных локусов. Описаны методы оценки условий среды на нерестилищах гольцов. Отдельную научную ценность представляет подробное описание экспериментальных работ по изучению токсического влияния терпеноидов и флавоноидов на рыб с разным тиреоидным статусом. Таким образом, в рамках представленной работы разными методами проанализирован обширный и репрезентативный материал.

Для обработки полученных результатов использованы адекватные приемы и программы (Statistica, MEGA X, GeneMarker, GenAlex, Structure, Arlequin, MorphoJ и другие), которые позволяют корректно проанализировать полученные первичные данные. Следует отметить, что все эти программы широко применяются исследователями во всем мире. Все методы соответствуют специфике поставленных задач.

Замечания к главе 2. Информация о количестве осадков для региона дается по работе (Кацыка, 1966), т.е. середины прошлого столетия. Учитывая глобальные изменения климата, происходящие в последние десятилетия, насколько верна эта информация сейчас и корректно ли на нее ссылаться? Остальные климатические характеристики автор приводит уже из более свежих работ 2012–2018 гг.

Почему в разных частях текста работы различаются сведения о численности рыб, у которых анализировали возраст? Так на стр. 36 указано, что «...было использовано 32 экз. КГ, 85 экз. МА и 108 экз. БГ.», а в таблице 1 в строке Определение возраста приводятся совершенно другие цифры. Тот же самый вопрос о проанализированном числе хрящевых черепов: на стр. 47 видим одни цифры, а в таблице 1 в строке Краниометрия – другие.

Нет сведений, как фиксировали пробы для молекулярно-генетического анализа.

Не очень удачная и верная фраза на стр. 39: «Д-петля митохондриальной ДНК (мтДНК) представляет собой некодирующий участок молекулы, регулирующий интенсивность ее транскрипции.» На самом деле Д-петля не регулирует интенсивность транскрипции, а здесь находятся участки, с которых транскрипция иницируется, т.е. начинается. Скорость транскрипции мтДНК регулируется иными механизмами.

На рис. 4 хорошо было бы хотя бы через дорожку указать температуры, при которых получен продукт, а также отметить, какой именно продукт использовали в дальнейшем. Если прибавлять к 48°C по 1,2°C для каждой дорожки, то получается, что надлежащим качеством обладает продукт на предпоследней дорожке – это верно? Хорошо было бы также указать, кто производитель маркера 100 пар нуклеотидов, использованного автором, так как маркеры разных фирм-производителей могут отличаться шагом между маркерными фрагментами.

В списке литературы отсутствует ссылка на работу Бусаровой с соавторами (2018), о которой упоминается на стр. 34, либо в тексте неверно указан год этой публикации.

В тексте есть неудачные фразы: например, на стр. 33, подпись к рисунку 1: «...наиболее верхних участков речной сети...»; на стр. 37 «...питание со дна...»; на стр. 38 «...периода в жизни жизненном цикле рыбы...», а также ошибки: на стр. 44 «Бенферрони» вместо «Бонферрони», на стр. 46 «длинной» вместо «длиной»; на стр. 52 «пероксимолбдатов» вместо «пероксимолибдатов» и др.

В главе 3 приводятся полученные соискателем **Результаты**. Выявлены различия трех форм гольцов по возрастной структуре популяций, времени наступления половозрелости,

размерно-весовым показателям, впервые подробно описаны общие особенности распределения разных форм гольцов в бассейне р. Камчатка, отмечены значительные различия в условиях их воспроизводства.

Интересным является факт обнаружения у мальмы карликовых самцов, в то время как для каменного и белого гольцов они не характерны. Изучено питание и образ жизни гольцов: показано, что каменный и белый гольцы являются рыбадными хищниками, в то время как мальма – бентофаг. Выявлены существенные различия паразитофауны белого и каменного гольцов, а также мальмы, обитающей непосредственно в реке и в озере Азабачье. По данным анализа полиморфизма контрольного региона (Д-петли) мтДНК трех форм гольцов р. Камчатка показана низкая степень их дифференциации: преобладающими у всех форм оказались одни и те же варианты, хотя для каждой формы и были выявлены единичные уникальные гаплотипы. Приведены результаты изучения генетической дифференциации мальмоидных гольцов по данным анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Показано, что популяции мальмы верхнего и нижнего участков реки не отличаются друг от друга, в то время как каменный голец значительно дифференцирован от мальмы верхнего течения. Дифференциация белого гольца от мальмы по сравнению с каменным гольцом выражена слабее.

Результаты сравнения морфологических признаков трех форм гольцов исследованного региона показали четкие различия специализированных форм от мальмы по форме тела, головы и хрящевого черепа. По особенностям строения головы и черепа рыбадные формы более схожи между собой, чем с мальмой, хотя по счетным признакам белый голец не отличается от мальмы. Выявлены качественные различия в расположении зубов трех форм гольцов на сошнике.

Особую ценность в работе представляет экспериментальное сравнение устойчивости молоди каменного гольца и мальмы к токсичному действию экстракта хвои. Выявлено, что каменный голец более устойчив к токсическому действию за счет повышенного уровня трийодтиронина. Связь уровня трийодтиронина и устойчивости к токсическим веществам убедительно показана в экспериментах по понижению и повышению тиреоидного статуса мальков мальмы.

Замечания к главе 3. Что значит «взрослые рыбы»? Как определяли, что рыба «взрослая»? Очевидно, имеются в виду половозрелые особи? Использование термина «взрослый» здесь не совсем удачно. Также не очень понятно, что считается «молодью» каменного и белого гольцов и мальмы, какие возраста имеются в виду?

Вывод о некорректности сравнения скорости роста форм по расчисленным длинам тела на основании измерения приростов отолитов (стр. 56) в принципе не нов. Для сравнения роста рыб одного вида, но из разных водоемов, или разных видов рыб используется такой показатель как удельная скорость роста (Чугунова, 1952).

На стр. 57 сказано, что доля особей каменного гольца с пустыми желудками составила 50%. Далее приводится информация о содержимом желудков «...всех питающихся особей КГ (61 особь)...». Если 50% – это 61 особь, то тогда общая выборка составила 122 особи, в то время как в таблице 1 указано, что рыб в этот вид анализа было взято 112.

В разделе, где обсуждаются различия белого гольца по индексу обилия паразитов (стр. 59–60), не очень понятно, по какому принципу для него выделяли группу «относительно мелких рыб», рыб «среднего размера» и рыб «с большими размерами тела». Почему, если индекс обилия паразитов, согласно определению на стр. 38, предполагает оценку массы тела хозяина, в данном случае указываются длины тела, а не масса? Почему при сравнении

белого гольца из разных участков водной системы нельзя было использовать экстенсивность инвазии? Насколько достоверно отличались по индексу обилия три выделенные группы белого гольца? О проверке достоверности различий (данные Тьюки-теста) говорится только в одном случае – для речной группы, которая выделяется по экстенсивности инвазии.

На стр. 63 не ясно, что автор имел в виду, описывая степень различий гаплотипов Д-петли: «...обнаружено пять новых и два ранее известных гаплотипа МА, различающихся между собой на 1-2 замены.» Если речь идет о гаплотипах SM-28 и SM-36, то они различаются на 1 нуклеотидную замену и вариаций тут быть не может. Если имеются в виду все выявленные варианты, то между некоторыми из них различия достигают 4 пар нуклеотидов, как, например, между МА6 и МА7.

Если ориентироваться на рис. 10, то число гаплотипов Д-петли у мальмы верхней части бассейна действительно 6, а у мальмы из нижнего течения реки – 10 гаплотипов, а не девять, как указано в тексте.

Может ли быть, что сниженные показатели полиморфизма каменного гольца по микросателлитному анализу – это результат того, что особей его взято в анализ в два раза меньше, чем мальмы?

С чем связана необходимость выделения мелкой и крупной мальмы при сравнении характеристик формы тела с каменным гольцом (стр. 79)? Ранее в тексте нигде это деление мальмы не применялось и здесь используется только в ходе канонического анализа, а при сравнении консенсусных форм тела – нет (рис. 15б). Была ли проверена корреляция координат точек по второму каноническому корню, по которому расходятся крупная и мелкая мальма, с длиной тела рыб? Какая мальма – крупная или мелкая, была использована в сравнительном анализе формы головы и черепа разных групп гольцов, о чем говорится на стр. 86–90?

Данные таблицы 14 не соответствуют описанию в тексте на стр. 95 и рис. 22. Очевидно, в таблице 14 под диагональю указаны результаты теста Неменьи для содержания фосфолипидов, над диагональю сверху – для уровня глюкозы и под чертой – для общей антиоксидантной активности?

Результаты сравнения физиологических показателей групп мальмы с разным тиреоидным статусом до воздействия хвойного настоя не очень понятны. В тексте на стр. 99 написано, что у гипертиреоидных рыб относительно контрольной группы изменилось только содержание фосфолипидов. Однако на рис. 23 видно, что у гипертиреоидных рыб (группа Т3) увеличиваются также показатели антиоксидантной активности и глюкозы. Для гипотиреоидных рыб (группа Тиомочевина на рис. 23) содержание фосфолипидов по графику оценить сложно, но скорее всего, оно снижается.

Замечания к оформлению рисунков: цвета для обозначения *Eubothrium salvelini* и *Philonema oncorhynchi* на рис. 8 выбраны не очень удачно. Кроме того, на рис. 9 не указано, какой параметр отражает шкала ординат; это становится понятно только из подписи к рисунку. В тексте на стр. 91 указано, что максимальные концентрации веществ терпеноидного и флавоноидного рядов были обнаружены в сентябре, а на рис. 20 для каменного гольца получается, что максимум их в ноябре.

В тексте есть ошибки, опечатки, неудачные фразы: например, на стр. 56, строка 2 пропущено слово «радиуса»; на стр. 60 ошибка в написании латинского названия паразита – *C. truttae*, а не *C. trutta*; на стр. 61 приведено название реки Ктилигина, в то время как на рис. 1 это р. Китильгина и ряд других.

В главе 4 **Обсуждение результатов** автор анализирует полученные результаты, используя имеющиеся по данной проблеме литературные источники, дает характеристику структуры популяций мальмоидных гольцов бассейна р. Камчатка, а также формулирует гипотезы о возможных причинах обособления каменного и белого гольцов. Важным результатом работы является вывод, что на формирование фенотипа каменного гольца в большой степени повлияла повышенная концентрация тиреоидных гормонов в организме, которая в свою очередь является компенсаторным ответом на токсификацию среды.

Обсуждаются различия в истории происхождения белого и каменного гольцов от мальмы, разные механизмы адаптивной радиации. В частности, показано, что дифференциация белого гольца от мальмы происходила по классическому сценарию разделения ресурсов пелагиали и бентали, в то время как выделение каменного гольца связано со специализацией к условиям обитания.

Замечания к главе 4. На стр. 116 приводится информация со ссылкой на работу (Савваитова, Кохменко, 1971), что белый голец отличается от мальмы по числу позвонков. А на стр. 82 со ссылкой на эту же работу обсуждается достоверное различие по числу лучей в спинном плавнике.

Замечания к оформлению ссылок на литературу и списка литературы. В тексте есть ссылки на работы, которых нет в списке литературы: стр. 108 ссылка на работу Adams, 1994; стр. 119 ссылка на работу Day et al., 2009. Отмечена и обратная ситуация, когда в списке литературы работы присутствуют, но они не цитируются в тексте: Ahi et al., 2015; Crane et al., 1994; De Santana et al., 2010; Fricke et al., 2021; McPhail, 1984; Sandlund, Lindem, 1994.

Не ясно, зачем автор дублирует работы, которые, будучи опубликованы в русскоязычном журнале, затем попали в переводную версию издания. Таким образом дублируются работы:

Олейник А.Г., Скурихина Л.А., Брыков В.А. Филогения гольцов рода *Salvelinus* по данным анализа митохондриальной ДНК // Генетика. 2015. Т. 51. № 1. С. 63–77. Английская версия этой же работы: Oleinik A.G., Skurikhina L.A., Brykov V.A. Phylogeny of charrs of the genus *Salvelinus* based on mitochondrial DNA data // Russian Journal of Genetics. 2015. V. 51. № 1. P. 55–68.

Осинов А.Г. Эволюционные взаимоотношения между основными таксонами *Salvelinus alpinus* – *Salvelinus malma* complex: результаты сравнительного анализа аллозимных данных разных авторов // Вопросы ихтиологии. 2001. Т. 41. № 2. С. 167. Английская версия этой работы: Osinov A.G. Evolution relationships between the main taxa of the *Salvelinus alpinus* – *Salvelinus malma* complex: results of comparative analysis of allozyme data of different authors // Journal of Ichthyology. 2001. V. 41. № 2. P. 167–183.

Шедько С.В., Мирошниченко И.Л., Немкова Г.А. Филогения лососевых рыб (Salmoniformes: Salmonidae) и ее молекулярная датировка: анализ мтДНК-данных // Генетика. 2013. Т. 49. № 6. С. 718–734. Английская версия этой работы: Shedko S.V., Miroshnichenko I.L., Nemkova G.A. Phylogeny of salmonids (Salmoniformes: Salmonidae) and its molecular dating: analysis of mtDNA data // Russian Journal of Genetics. 2013. V. 49. № 6. P. 623–637.

В целом, однако, перечисленные выше замечания и недочеты несколько не умаляют актуальность, новизну и научное значение представленной к защите диссертационной работы. Основные положения диссертации отражены в автореферате и 8 публикациях, в том числе пяти статьях в изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией

при Министерстве образования и науки Российской Федерации. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Диссертационная работа Мельника Николая Олеговича «Эндемичные гольцы (*Salvelinus*: Salmonidae) бассейна реки Камчатка (морфология, экология и происхождение)» представляет собой законченное исследование, выполненное на основе комплексного применения современных разносторонних методов и вносит существенный вклад в исследование и разработку проблемы адаптивной радиации не только рыб, но и живых организмов в целом. По актуальности, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация 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 – Мельник Николай Олегович – заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.13. – «ихтиология».

Официальный оппонент

Боровикова Елена Александровна,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории Экологии рыб
ФГБУН Институт биологии
внутренних вод им. И.Д. Папанина
Российской Академии Наук
Сайт Института: <https://www.ibiw.ru>
152742, Ярославская область, Некоузский район,
пос. Борок, д. 109.
моб. тел. +7 920 650 80 50
e-mail: elena.ibiw@gmail.com

Е.А. Боровикова

21 сентября 2021 г.