

РЕЦЕНЗИЯ №1

На статью: «Рутинное определение четырех симпатрических видов каляноидных копепоид *Pseudocalanus spp.* в атлантическом секторе Арктики с помощью видо-специфической полимеразной цепной реакции»

Автора: Ершова Е.А.

Этап № 1

Название статьи: Рутинное определение четырех симпатрических видов каляноидных копепоид 3 *Pseudocalanus spp.* в Атлантическом секторе Арктики с помощью видо-специфической 4 полимеразной цепной реакции.

Направление, цель исследований (ключевые слова): зоопланктон, пелагические экосистемы, копепоиды, Copepoda, 25 *Pseudocalanus*, виды-двойники, видо-специфичная полимеразная цепная реакция, Арктика.

Разработана система рутинного определения видовой принадлежности представителей рода *Pseudocalanus* с помощью метода видоспецифической амплификации участка гена COI и визуализацией в агарозном геле.

Научная ценность результатов: Результаты имеют научную ценность, так как с помощью разработанного метода, видо-специфичной 19 полимеразной цепной реакции, возможно массовое определение рачков любой стадии развития, включая 20 науплиев. Данный метод может послужить прекрасным инструментом для изучения видо-специфичной 21 биологии данной группы, описании их жизненных циклов, а также мониторинга изменений в Арктических 22 морских экосистемах под влиянием меняющихся климатических условий.

Актуальность работы: Работа актуальна как в прикладном, так и в теоретическом отношении, так как содержит разработанную довольно недорогую методику исследования распределения и встречаемости значимых компонентов экосистемы, морфологический анализ которых затруднен или невозможен.

Возможное влияние работы на фундаментальные и прикладные исследования: Результаты исследований могут быть использованы для

Ясность и глубина изложения: Изложение материала ясное, хотя некоторые уточнения все же требуются.

Достаточность ссылок на имеющиеся публикации: ссылок на публикации достаточно.

Заключение: Публикация статьи возможна.

Развернутый отзыв о работе, замечания и дополнительные комментарии:

В работе обсуждается созданная автором методика дешевого и быстрого определения видовой принадлежности представителей рода *Pseudocalanus*, встречающихся в северных морях. В введении описана суть проблемы определения этой группы и охарактеризована значимость решения задачи рутинного определения как для мониторинга, так и для решения ряда вопросов биологии видов и биогеографии. В разделе «Материалы и методы» автором изложены этапы эксперимента и условия его проведения, приведен

объем проанализированного материала. В разделе «Результаты» сначала приведены первичные результаты амплификации (количество прошедших экспериментов, количество не прошедших экспериментов, отмечены эксперименты с возможной контаминацией). Далее кратко изложены полученные в экспериментах соотношения видов и уточнено их распространение в исследуемом регионе. «Обсуждение» содержит обсуждение полученных результатов, как с точки зрения экологии и биогеографии, так и с точки зрения самого предложенного автором метода.

Замечания

На мой взгляд, использование выражения «молекулярный метод» не совсем точно. Правильнее говорить скорее «методы молекулярной генетики», «метод видоспецифичной ПЦР».

Методика получения видоспецифических праймеров не совсем ясна. Так, например, не уточнено, в чем состоит их специфичность (определенные нуклеотиды на 3' кодоне или еще каким-либо способом она достигалась), оптимизировали ли температуру по каждому праймеру отдельно и в смеси. Проводили ли тест по смеси ДНК разных видов? Будут ли полученные праймеры давать амплификат на других представителях группы и близких видах? Проводили ли секвенирование, полученного при тестировании на заранее определенных (как я поняла, но не поняла, каким методом) 5-10 особях, амплификата?

Не совсем понятно, что имеет автор под термином «консенсусный сиквенс» в следующей фразе:

Комплекс видо-специфичных дегенеративных праймеров был разработан для четырех видов *P. acuspes*, *P. minutus*, и *P. moultoni* и *P. elongatus* на основе консенсусных сиквенсов, имеющих в базе BOLD и самостоятельно полученных сиквенсов.

Аккуратно посчитав приведенные автором объемы в реакции, я получила, что автор ставил пцр в реакции объемом 10,5 мкл, а не 10 мкл, как он утверждает.

Очень странным выглядит автора, что при наличии 2 полосок в реакции проводили определение только по наиболее яркой – мне кажется, что без дополнительных исследований (например, повторной постановки ПЦР и секвенирования вырезанных из геля полос) этот методический прием несколько не обоснован.

Во фразе «Очищение выделенного ДНК не проводилось» либо есть несогласование, либо не хватает слова «препарата».

Праймер, который в англоязычной литературе обозначают как «forward» - обычно переводят как прямой, а не передний.

Я считаю, что использование возвратных глаголов в конструкциях типа: «ДНК хранилось», «определение проводилось» не корректно с точки зрения стиля и смысла и должно быть заменено на: «ДНК выделяли», «определение проводили».

Отсутствие продукта амплификации в данных реакции может быть из-за плохой сохранности материала, ошибки при выделении ДНК, или принадлежности данных особей к другому виду или видам, чем те, которые учитывались нами.

– кроме перечисленных причин, возможно, что присутствует мутация в участке, комплементарном праймеру.

Мне не совсем ясна следующая фраза, очень хочется попросить автора ее либо уточнить, либо переформулировать:

«Соотношение видов на 138 трех станциях было резко неравномерным...»

Подпись. Рецензент № 1, 05.11.2019.

+++++

Ответ Рецензенту № 1 на Рецензию от 18.11.2019 на статью автора Ершовой Е.А.: «Рутинное определение четырех симпатрических видов каляноидных копепоид *Pseudocalanus spp.* в атлантическом секторе Арктики с помощью видо-специфической полимеразной цепной реакции».

Рецензент: на мой взгляд, использование выражения «молекулярный метод» не совсем точно. Правильнее говорить скорее «методы молекулярной генетики», «метод видоспецифичной ПЦР».

Автор: Исправлено на «молекулярно-генетический метод»

Рецензент: Методика получения видоспецифических праймеров не совсем ясна. Так, например, не уточнено, в чем состоит их специфичность (определенные нуклеотиды на 3' кодоне или еще каким-либо способом она достигалась), оптимизировали ли температуру по каждому праймеру отдельно и в смеси. Проводили ли тест по смеси ДНК разных видов? Будут ли полученные праймеры давать амплификат на других представителях группы и близких видах? Проводили ли секвенирование, полученного при тестировании на заранее определенных (как я поняла, но не поняла, каким методом) 5-10 особях, амплификата?

Автор: Добавила информацию о разработке праймеров. Секвенирование полученного таким путем амплификата не проводили, т.к. я не видела в этом необходимости – но для 16 штук было проведено параллельное секвенирование COI этих же особей по другому набору праймеров, результаты которого подтвердили видовую принадлежность (добавила информацию об этом в методы). Тест по смеси ДНК тоже нарочно не проводили (т.к. я не видела в этом смысла), но, если это необходимо (для получения красивой картинки, например), это конечно довольно легко сделать.

По поводу амплификации близких видов - Поскольку эти праймеры при данных температурных условиях не амплифицируют даже другие виды *Pseudocalanus* (отличающиеся на 2-3 основания), то логично предположить, что они не будут амплифицировать и виды других родов. Да и суть метода такова, что до рода рачка все-таки должен определить исследователь (с этим обычно проблем нет, если это конечно не студент-первокурсник). Что касается других 3 *Pseudocalanus*, не рассматриваемых здесь: для одного (*P. major*) нет сиквенсов в базе данных, поэтому я ничего сказать не могу, *P. newmani* отличается от всех используемых здесь праймеров на 3-7 оснований, и с ним проблем не должно быть. *P. minutus* довольно похож на *P. acuspes* и в Чукотском море у меня были с ним проблемы, но считается, что в Атлантике он жить не должен. В любом случае, у меня нет материала по этим видам, чтобы подтвердить или опровергнуть эту информацию, но для данных регионов это не должно быть актуально – 4 вида, которые в статье, вероятнее всего - исчерпывающий список.

Рецензент: Не совсем понятно, что имеет автор под термином «консенсусный сиквенс» в следующей фразе:

94 Комплекс видо-специфичных дегенеративных праймеров был разработан для
95 четырех видов *P. acuspes*, *P. minutus*, и *P. moultoni* и *P. elongatus* на основе консенсусных
96 сиквенсов, имеющихся в базе BOLD и самостоятельно полученных сиквенсов.

Автор: Переписала всю эту часть.

Рецензент: Аккуратно посчитав приведенные автором объемы в реакции, я получила, что автор ставил пир в реакции объемом 10,5 мкл, а не 10 мкл, как он утверждает.

Автор: Да, вы абсолютно правы, это ошибка – объем воды указан по модифицированному протоколу, где содержались праймеры только для 3-х видов. Исправила.

Рецензент: Очень странным выглядит автора, что при наличии 2 полосок в реакции проводили определение только по наиболее яркой – мне кажется, что без дополнительных исследований (например, повторной постановки ПЦР и секвенирования вырезанных из геля полос) этот методический прием несколько не обоснован.

Автор: Определение проводили только при очень очевидном преобладании одной полоски над другой – в том случае, где они были приближенной яркости, результат считался недействительным. Я согласна, что из текста может следовать, что это делали регулярно, но по факту, из тех 132, что указаны в статье, это было 2 особи (А из нескольких тысяч, проанализированных этим методом на сегодняшний день, менее 1%). И чаще всего этому было логичное объяснение, например, перепутаны крышечки. Исправила, чтобы прояснить этот момент.

Рецензент: Во фразе «Очищение выделенного ДНК не проводилось» либо есть несогласование, либо не хватает слова «препарата».

Автор: Переделано на Очищение выделенной ДНК не проводили.

Рецензент: Праймер, который в англоязычной литературе обозначают как «forward» - обычно переводят как прямой, а не передний.

Автор: Исправлено.

Рецензент: Я считаю, что использование возвратных глаголов в конструкциях типа: «ДНК хранилось», «определение проводилось» не корректно с точки зрения стиля и смысла и должно быть заменено на: «ДНК выделяли», «определение проводили».

Автор: Я переписала (плюс исправила некоторые другие языковые/стилистические ошибки).

Рецензент: 135 Отсутствие продукта амплификации в данных реакции может быть из-за плохой 136 сохранности материала, ошибки при выделении ДНК, или принадлежности данных особей 137 к другому виду или видам, чем те, которые учитывались нами.

– кроме перечисленных причин, возможно, что присутствует мутация в участке, комплементарном праймеру.

Автор: Да, это так, я добавила эту фразу в текст.

Рецензент: Мне не совсем ясна следующая фраза, очень хочется попросить автора ее либо уточнить, либо переформулировать:

«Соотношение видов на 138 трех станциях было резко неравномерным...»

Автор: Предложение было переформулировано следующим образом:

Количественное соотношение между видами на четырех исследуемых станциях было резко неравномерным.

Благодарю за рецензию и ценные замечания!

Подпись. Авторы. 18.11.2019

+++++

Этап №2

Добрый день,

Я пишу о результатах повторного рецензирования статьи «Рутинное определение...»

Мною обнаружены незначительные ошибки, после исправления которых, еще одного этапа рецензирования не потребуется, а статья может быть опубликована.

"132 по методике, описанной в Ershova et al., 2019, которые были определены до вида с"

- в списке литературы № 1 эта публикация отсутствует, а во втором списке, представленном после Абстракта, эта работа есть.

"В двух реакциях было выявлено две видо-специфичные полосы, скорее всего, из-за контаминации из соседних лунок, но одна из них была очевидно намного ярче, и в этом случае определение проводилось по ней."

- Написано не совсем понятно. Я предлагаю исправить: "Для двух образцов мы получили смешанный продукт ПЦР двух длин. В данном случае, поскольку полученные полосы на агарозном геле значительно различались по яркости определение вида проводили по наиболее яркой полосе."

В таблице 2 на странице 5 явная опечатка во второй строке всего должно быть 32 особи, а не 22, как написано. Однако, в такой ситуации указание 150 из 132 реакций, достаточное количество продукта амплификации для определения не соответствует результатам таблицы. Поэтому надо, чтобы автор аккуратно посчитал количество образцов, указанных в таблицах.

С уважением, Рецензент № 1.

Подпись. Рецензент № 1, 20.01.2020.

+++++

Ответ Рецензенту № 1 на Повторную Рецензию № 2-1 от 20.01.2020 на доработку статьи автора Ершовой Е.А. «Рутинное определение четырех симпатрических видов каляноидных копепод *pseudocalanus spp.* в атлантическом секторе Арктики с помощью видо-специфической полимеразной цепной реакции»

Рецензент: *Добрый день,*

Мною обнаружены незначительные ошибки, после исправления которых еще одного этапа рецензирования не потребуется, а статья может быть опубликована

"132 по методике, описанной в Ershova et al., 2019, которые были определены до вида с"

- в списке литературы № 1 эта публикация отсутствует, а во втором списке, представленном после Абстракта, эта работа есть.

Автор: Добавлено.

Рецензент: *"В двух реакциях было выявлено две*

139 видо-специфичные полосы, скорее всего, из-за контаминации из соседних лунок, но одна

140 из них была, очевидно, намного ярче, и в этом случае определение проводилось по ней."

- Написано не совсем понятно. Я предлагаю исправить: "Для двух образцов мы получили смешанный продукт ПЦР двух длин. В данном случае, поскольку полученные полосы на агарозном геле значительно различались по яркости определение вида проводили по наиболее яркой полосе."

Автор: Исправлено.

Рецензент: *В таблице 2 на странице 5 явная опечатка во второй строке всего должно быть 32 особи, а не 22, как написано. Однако, в такой ситуации указание*

150 Из 132 реакций, достаточное количество продукта амплификации для определения

не соответствует результатам таблицы. Поэтому надо, чтобы автор аккуратно посчитал количество образцов, указанных в таблицах.

Автор: Цифры пересчитаны и теперь сходятся.

Подпись. Авторы. 18.02.2020.

+++++

Подтверждение Рецензента №1 на публикацию

От редакции: Автор прислала доработанную версию статьи, где замечания рецензента учтены. **Этап 2 без повторного рецензирования, по решению Рецензента 1.**