

*На правах рукописи*

**ТОТИКОВ АЗАМАТ АЛЬБЕРТОВИЧ**

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНИЯ РОДА *MUSTELA*  
(СЕМ. MUSTELIDAE)**

1.5.7 – Генетика  
(биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Лаборатории разнообразия и эволюции геномов Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, и на Кафедре цитологии и генетики Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Графодатский Александр Сергеевич**  
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории разнообразия и эволюции геномов Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Официальные оппоненты: **Родионов Александр Викентьевич**  
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биосистематики и цитологии ФГБУН Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН, г. Санкт-Петербург

**Нуриддинов Мирослав Абдурахимович**  
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Лаборатории геномных технологий для медицинской генетики Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г. на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Подсемейство Mustelinae является крупнейшей и наиболее разнообразной группой маленьких хищных млекопитающих в семействе Куных (Mustelidae), включающей по меньшей мере 19 видов в родах *Mustela* и *Neogale*, распространенных в Голарктике, Неотропиках и Индомалазии (Macdonald et al. 2017). Многие из этих видов эксплуатируются человеком в меховой промышленности, сельском хозяйстве, в традиционной медицине стран Азии, в качестве домашних животных или модельных видов (Belser et al. 2011; Harrington et al. 2017; Hiller and Vantassel 2022). Исследования Mustelinae часто были сосредоточены на описании морфологических признаков, однако эти работы быстро столкнулись со сложностью их изучения из-за выраженного полового диморфизма, возрастной изменчивости и наличия межвидовых гибридов (Kitchener et al. 2017). Цитогенетические исследования выявили сложную эволюцию кариотипов, включающую слияния и разделения хромосом, и существенные различия в числе хромосомных плеч между *Mustela* и *Neogale* (Graphodatsky et al. 1989). Филогенетические исследования Mustelinae (Harding and Smith 2009; Hassanin et al. 2021; Patterson et al. 2021; Patterson et al. 2025), уточнили таксономические границы между родами *Mustela* и *Neogale*. Классификация на уровне видов остается затрудненной из-за быстрой эволюционной диверсификации этой группы (Koepli, Kanchanasaka, et al. 2008; Law et al. 2018; Hassanin et al. 2021), в результате которой появились как морфологически неразличимые виды, так и плохо разрешенные узлы на филогенетических деревьях (Koepli, Deere, et al. 2008). Ситуацию осложняет также гибридизация между некоторыми видами (Cabria et al. 2011; Cserkés et al. 2021), приводящая к неоднозначным филогенетическим сигналам (Etherington et al. 2022). Все это затрудняет определение общего числа видов и понимание их взаимосвязей в подсемействе Mustelinae. На сегодняшний день не существует единого научного консенсуса ни по числу видов, ни по числу подвидов.

В настоящее время полные митохондриальные геномы доступны почти для всех видов подсемейства Mustelinae, за исключением яванского колонка, *M. lutreolina*. Однако с полногеномными данными ситуация обстоит хуже: отсутствуют сборки геномов для 12 видов. Среди остальных видов, сборки геномов хромосомного уровня доступны лишь для шести, а на уровне скаффолдов лишь для двух. Несмотря на растущий объем генетических данных, их распределение по видам Mustelinae остается неравномерным. Сравнительный анализ, основанный на интеграции ядерных и митохондриальных данных, является мощным инструментом для изучения эволюционных процессов, позволяющим выявлять как общие черты, так и ключевые отличия между близкородственными видами. Такой подход особенно важен в контексте природоохранной биологии, где понимание генетического разнообразия, филогенетических связей и эффективной численности популяций критично для разработки эффективных стратегий сохранения биоразнообразия. В данной работе был проанализирован

обширный набор данных, включающий как новые, так и ранее опубликованные данные, а именно: 9 сборок геномов, 50 образцов полногеномного ресеквенирования и 149 полных митохондриальных геномов. В этот набор входят три новые сборки геномов, а также девять новых образцов полногеномного ресеквенирования, полученные в рамках данной работы. Используя эти данные, исследование расширяет существующие знания о генетическом разнообразии видов *Mustelinae* и их филогенетических взаимоотношениях, а также предоставляет данные об эффективной численности популяций, вариации размера геномов, хромосомных перестройках и предковом кариотипе *Mustela* и *Mustelinae*.

**Цель и задачи исследования.** Цель: Комплексная оценка генетического разнообразия и реконструкция филогенетических взаимоотношений между представителями рода *Mustela* на основе анализа данных полногеномного секвенирования с использованием современных биоинформатических подходов. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Выполнить сборку геномов *de novo* для *Mustela sibirica* и *M. strigidorsa*. Улучшить общедоступную сборку генома *M. nivalis* до хромосомного уровня, а также провести оценку качества используемых в работе сборок геномов.
2. Оценить уровень гетерозиготности и содержание гомозиготных участков в геномах исследуемых видов *Mustela*. Провести сравнительный анализ генетического разнообразия с данными по другим видам *Carnivora*.
3. Реконструировать филогенетические взаимоотношения между представителями подсемейства *Mustelinae* на полногеномном уровне, а также с использованием митохондриальных геномов. Провести сравнение полученных деревьев с учетом возможных случаев интрогрессии и неполной сортировки линий.
4. Реконструировать популяционную историю исследуемых видов.
5. Идентифицировать синтенные блоки в геномах исследуемых видов, и реконструировать предковые хромосомные перестройки.

**Научная новизна.** Настоящая работа представляет собой первое комплексное полногеномное исследование рода *Mustela* с использованием современных методов биоинформатики. Впервые получены *de novo* сборки ядерных геномов для сибирского колонка (*M. sibirica*) и белополосой ласки (*M. strigidorsa*), а также выполнено улучшение общедоступной сборки генома обыкновенной ласки (*M. nivalis*) до хромосомного уровня. Это позволило существенно расширить объем доступных референсных данных для рода *Mustela*. Используя полученные сборки геномов с общедоступными, результаты работы предоставляют новую информацию о хромосомных перестройках между видами *Mustelinae*, ранее не зафиксированных методами классической цитогенетики. Включение в анализ базального вида *M. strigidorsa* позволило уточнить датировку событий слияния и разделения хромосом, сформировавших предковый кариотип *Mustela*. Впервые на полногеномном уровне проведено сравнение генетического разнообразия между видами рода *Mustela* по показателям уровня гетерозиготности и

содержания участков гомозиготности. Впервые проведен сравнительный анализ исторической динамики эффективной численности популяций большинства видов Mustelinae с применением методов моделирования эффективной численности популяций, что позволило определить бутылочные горлышки как следствие вероятного влияния палеоклиматических факторов. Впервые проведен филогенетический анализ подсемейства Mustelinae как на полногеномных данных, так и на расширенном наборе полных митохондриальных геномов, что позволило уточнить и прояснить филогенетическое положение некоторых видов.

**Теоретическая и научно-практическая значимость исследования.** Результаты настоящего исследования обладают высокой теоретической и практической значимостью и могут быть использованы в качестве методологической и эмпирической базы для последующих популяционно-генетических исследований близкородственных видов Mustelidae и других семейств хищных млекопитающих. Практическая значимость исследования проявляется в возможности применения полученных результатов при разработке программ по сохранению биологического разнообразия, включая стратегическое планирование охраны исчезающих, уязвимых и потенциально угрожаемых видов. Полученные геномные сборки являются ценным ресурсом для последующих филогенетических, популяционно-генетических и функциональных исследований, как в пределах Mustelinae, так и во всем семействе Mustelidae. Эти данные также могут быть использованы при решении таксономических вопросов, включая верификацию таксономической независимости спорных видов. Кроме того, результаты анализа вариации размера геномов в зависимости от географического происхождения образцов могут быть учтены при планировании стратегии секвенирования, особенно в контексте оценки необходимой глубины покрытия.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Геномы степного (*Mustela eversmanii*) и лесного (*M. putorius*) хорьков содержат протяженные участки гомозиготности, что является одним из признаков инбредной депрессии, риск развития которой подтверждает наблюдаемое сокращение численности их популяций и снижение уровня гетерозиготности.
2. Расхождение родов *Mustela* и *Neogale* в подсемействе Mustelinae произошло до диверсификации белополосой ласки (*M. strigidorsa*), что делает этот редкий южноазиатский вид базальным в роде *Mustela*.
3. Предковые кариотипы подсемейства Mustelinae ( $2n=42$ ) и рода *Mustela* ( $2n=44$ ) сформировались в результате трех базальных хромосомных разделений, два из которых произошли на ранних этапах радиации подсемейства, а третье – после дивергенции рода *Mustela* от рода *Neogale*, но до диверсификации современных видов *Mustela*.

**Апробация работы.** Исследование представлено 4 публикациями в рецензируемых научных журналах, индексируемых Scopus, Web of Science и

РИНЦ. Работа была представлена на 3 международных конференциях. Результаты диссертационного исследования ежегодно заслушивались на заседаниях кафедры ЦиГ ФЕН НГУ в период прохождения аспирантуры в 2021-2025 гг. Апробация диссертационной работы проведена на: межлабораторном семинаре ИМКБ СО РАН, протокол №3 от 25 августа 2025 года; заседании кафедры цитологии и генетики ФЕН НГУ, протокол №4 от 9 февраля 2026 года; заседании межлабораторного семинара Отделения генетики животных и человека ИЦиГ СО РАН, протокол №1 от 9 февраля 2026 года.

**Структура и объем работы.** Структура диссертационной работы представлена введением, обзором литературы, материалами и методами, результатами, обсуждением, заключением, выводами, списком литературы, приложениями. Общий объем работы составляет 204 страниц машинописного текста, содержащего 28 иллюстраций, 3 таблицы, 335 цитируемой литературы и 18 приложений.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Входные данные.** Создание клеточных культур, выделение ДНК и подготовку библиотек выполнили сотрудницы ИМКБ СО РАН. Клеточные линии получены из УНУ “Криобанк культур клеток” ИМКБ СО РАН. Сборки генома хромосомного уровня: первичные линии клеток фибробластов самцов *M. strigidorsa* и *M. nivalis*. Скаффолдный уровень: замороженная мышечная ткань самца *M. sibirica*. Полногеномное ресеквенирование *M. nivalis*, *M. erminea*, *M. sibirica*, *M. putorius*: мышечная ткань и фибробласты. ДНК выделяли фенол-хлороформным методом (Sambrook and Russell 2006), фрагментировали на Covaris, библиотеки готовили TruSeq DNA PCR-Free (Illumina). Для хромосомных сборок – Hi-C библиотеки (Rao et al. 2014). Секвенирование: Illumina NovaSeq 6000, PE150. Для *M. strigidorsa* дополнительно была получена ONT библиотека (SQK-ULK114), PromethION R10.4.1. Все полученные в ходе работы данные опубликованы в базе NCBI, BioProject PRJNA1146985.

**Сборка геномов.** Геном *M. strigidorsa* (GCA\_048197275.1) собран из данных Illumina, Oxford Nanopore и Hi-C. После фильтрации (Porechop v0.5.0 (Wick et al. 2017)) и обрезки прочтений (Chopper v0.8.0 (De Coster and Rademakers 2023)), черновая сборка Illumina (w2rap-contigger (Clavijo et al. 2017)) была проскаффолдена (SAMBA (Zimin and Salzberg 2022)), откорректирована (POLCA (Zimin and Salzberg 2020)) и выровнена по хромосомам при помощи Juicer v1.6 (Durand et al. 2016) и 3D-DNA v210623 (Dudchenko et al. 2017) с последующей ручной правкой ошибок сборки в Juicebox v2.16.00 (Dudchenko et al. 2018). Разрывы были закрыты Nanopore-данными, с повторной коррекцией при помощи данных Illumina. Черновая сборка генома *M. nivalis* (GCA\_019141155.1, (Miranda et al. 2021)) улучшена до хромосомного уровня (GCA\_048197165.1) с использованием Hi-C данных. После удаления гаплотипических дубликатов (purge\_dups v1.2.6 (Guan et al. 2020)), определения сайтов рестрикции (*Csp6I*+*MseI*) данные Hi-C

были выровнены на фильтрованную сборку (Juicer v1.6) и использованы для скаффолдинга (3D-DNA v210623) с последующей ручной коррекцией в Juicebox v2.16.00. Геном *M. sibirica* (GCA\_048197585.1) собран из парных прочтений Illumina (образец E19, SRR30226579) с помощью w2rap-contigger, а псевдохромосомная сборка получена с помощью RagTag v2.1.0 (Alonge et al. 2022) с использованием сборки *M. erminea* (GCF\_009829155.1) в качестве референса. Псевдохромосомные сборки *M. evermannii* и *M. putorius* получены с помощью RagTag v2.1.0 на основе ранее опубликованных скаффолдных и хромосомных сборок близкородственных видов.

**Полногеномные выравнивания, сопоставление с кариотипами и синтения.** Для присвоения номенклатуры хромосомным скаффолдам *M. nivalis* выполнены парные полногеномные выравнивания (WGA) с *N. vison*, *M. lutreola* и *M. erminea*; для *M. strigidorsa* с *M. erminea*. Перед WGA, повторы идентифицировали (TRF v4.09.1 (Benson 1999), WindowMasker v1.0.0 (Morgulis et al. 2006), RepeatMasker v4.1.6 (Tarailo-Graovac and Chen 2009)) и маскировали (BEDTools v2.31.0 (Quinlan and Hall 2010)), затем проводили выравнивания (LAST v1519 (Kielbasa et al. 2011)) и визуализацию (MAVR v0.97 (<https://github.com/mahajrod/MAVR>)). Номера хромосом присвоены на основе синтении, данных Zoo-FISH (Graphodatsky et al. 2020) и сравнительных карт G-окрашенных хромосом (Graphodatsky et al. 2002), с принятой номенклатурой и префиксом “chr”. Для анализа синтении использованы хромосомные сборки 11 видов. Консервативные однокопийные ортологичные гены определяли в BUSCO v5.6.1 (Manni et al. 2021) с базой данных Mammalia из OrthoDB v.10.1 (2024-01-08) (Kriventseva et al. 2019). По ним построено филогенетическое дерево (IQ-TREE v2.2.0 (Nguyen et al. 2015)) в BuscoClade v1.7 (<https://github.com/tomarovsky/BuscoClade>). Множественное WGA выполнено в Progressive Cactus v2.8.0 (Armstrong et al. 2020). Синтенные блоки извлечены с помощью halSynteny v2.2 (Krashennikova et al. 2020). Визуализация – MACE v1.1.32 (<https://github.com/mahajrod/MACE>). Центромеры локализованы по сравнительному анализу WGA с геномами *C. familiaris* и *H. sapiens*, данным синтении и общедоступными картами G-окрашенных хромосом (Graphodatsky and Radzhabli 1988; Cavagna et al. 2000; Graphodatsky et al. 2002; Nie et al. 2002; Graphodatsky et al. 2020; Kliver et al. 2023). Цитогенетическая интерпретация выполнена к.б.н. П. Л. Перельман.

**Реконструкция хромосомных перестроек и определение предкового кариотипа.** На основе синтении построена бинарная матрица (признак – перестройка; состояние – Y/N). Эволюция признаков реконструировалась по дереву ML с использованием модели цепи Маркова (ape v5.8 (Paradis and Schliep 2019)). Узлы классифицировались как Y/N или неопределенные (U) в зависимости от вероятности состояния PN. Координатная система была основана на геноме *M. strigidorsa* как базального вида *Mustela*, чьи хромосомы участвуют только в слияниях. Для признаков, где корень имел состояние Y, проводилась инверсия состояния во всей матрице.

**Оценка качества и фильтрация данных, определение размера геномов.** Фильтрация прочтений – EМА v0.6.2 (Shajii et al. 2018), Cookiecutter (Starostina et al. 2015) и Trimmomatic v0.39 (Bolger et al. 2014). Качество прочтений – FastQC v0.12.0 (Andrews 2010), KrATER v2.5 (Kliver et al. 2017) и GenomeScope v2.0 (Ranallo-Benavidez et al. 2020). Распределения 23-меров считали Jellyfish v2.3.0 (Marçais and Kingsford 2011). Размер геномов и покрытие оценивали KrATER и GenomeScope2. Наличие контаминации проверяли с Kraken v2.1.3 (Wood and Salzberg 2014) на базе RefSeq (10.05.2023), дополненной геномами соответствующих видов *Mustela*. Качество и целостность сборок проверяли с помощью QUAST v5.0.2 (Gurevich et al. 2013) и BUSCO v5.6.1 с базами OrthoDB v.10.1 (2024-01-08): Mammalia, Laurasiatheria и Carnivora.

**Случайная выборка и выравнивание полногеномных прочтений.** Покрытие полногеномных данных нормализовали до  $\sim 12\times$ , выполняя случайную подвыборку с помощью BBmap v38.96 (Bushnell 2014), при доле выборки  $\geq 0.8$  подвыборка не проводилась. Прочтения выравнивали на сборки геномов с помощью BWA v0.7.17-r1188 (Li and Durbin 2009), обработку и сортировку выравниваний выполняли Samtools v1.18 (Li et al. 2009). Расчет покрытия – Mosdepth v0.3.3 (Pedersen and Quinlan 2018).

**Определение координат PAR и поиск генетических вариантов.** Для точного учета гаплоидной части X-хромосомы у самцов, определяли псевдоаутосомный регион (PAR) с помощью Biocrutch (<https://github.com/tomarovsky/Biocrutch>). Генетические варианты выявляли с использованием Vcftools v1.18 (Li 2011) с учетом пола и PAR, фильтровали по качеству. Индивидуальные маски участков с аномальным покрытием создавали скриптом из MAVR v0.97 и применяли через BEDTools v2.31.0. Варианты разделяли на гетеро- и гомозиготные SNP и инделы, гетерозиготные SNP подсчитывали в перекрывающихся окнах 1 млн п.н. с шагом 100 тыс п.н. Участки гомозиготности (RoH) определяли на основе плотности гетерозиготных SNP в окнах 100 тыс п.н. с шагом 10 тыс п.н. на всех аутосомах. Визуализация – MACE v1.1.32.

**Классификация образцов *Mustela erminea sensu lato*.** Для анализа популяционной структуры и интрогрессии у *M. erminea* и *M. richardsonii* использовали фильтрованные SNP в аутосомах и PAR с общей маской, созданной объединением индивидуальных масок покрытия. Исключали варианты с отсутствием данных (PLINK v1.9 (Purcell et al. 2007)), затем убирали SNP с высоким сцеплением (LD) по порогу  $r^2=0.7$ . Провели PCA и глобальный анализ интрогрессии с ADMIXTURE v1.3.0 (Alexander et al. 2009) при  $K=2-5$ , повторяя трижды. Для  $K=2$  провели локальный ADMIXTURE по скользящим окнам 1 млн п.н. с шагом 100 тыс п.н. на сборке *M. erminea*. Визуализация – pong v1.5 (Behr et al. 2016).

**Реконструкция популяционной истории.** Популяционную историю восстанавливали с помощью PSMC v0.6.5 (Li and Durbin 2011) на данных с и без половых хромосом. Генетические варианты определяли с помощью

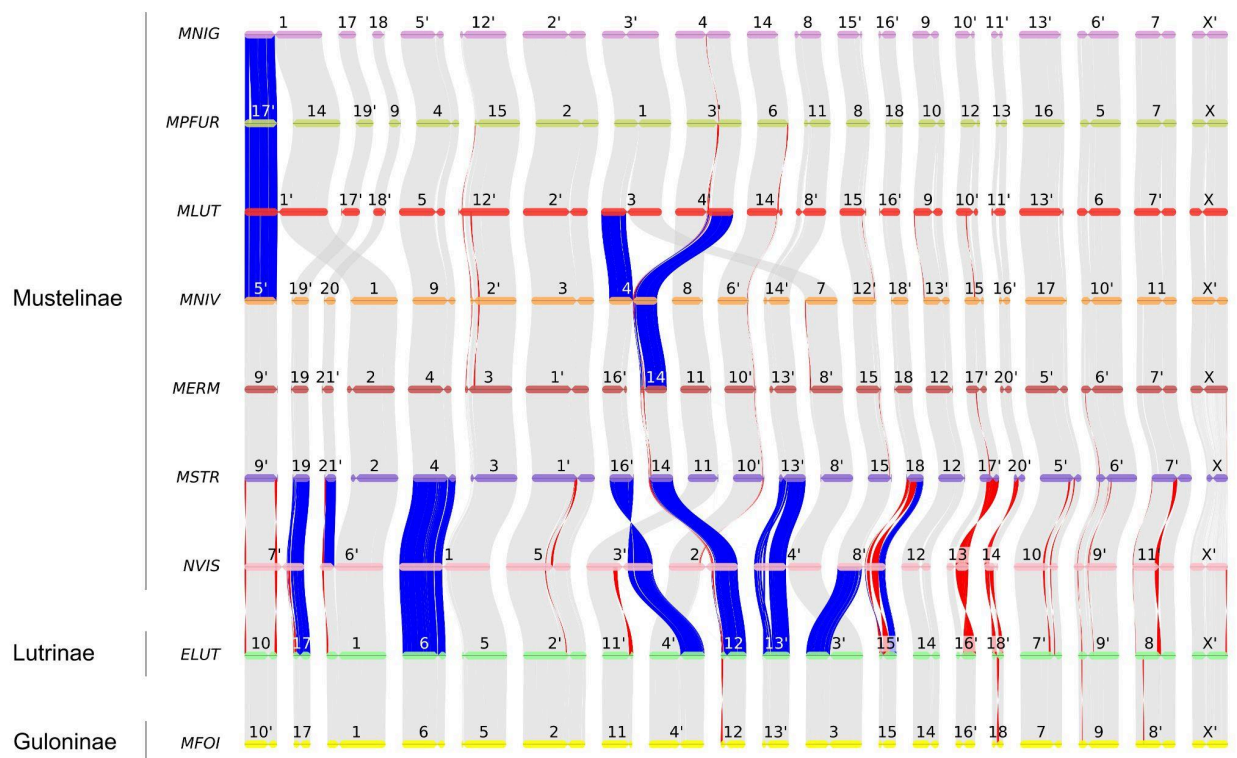
Samtools v0.1.19, формировали диплоидные консенсусы с фильтрацией по индивидуальному покрытию. Для каждого образца было получено 100 бутстреп репликатов. Времена генерации учитывали размер вида (3 года для малых видов, 4 – для средних). В качестве скорости мутаций было использовано  $4.64 \times 10^{-9}$  замен на поколение, с нижней ( $2.94 \times 10^{-9}$ ) и верхней ( $7.37 \times 10^{-9}$ ) границами доверительного интервала (Bergeron et al. 2023).

**Филогеномный анализ.** Для всех образцов полногеномного ресеквенирования созданы альтернативные сборки геномов (GATK v4.4.0.0 (Van der Auwera et al. 2013)) на основе референсов и фильтрованных SNP. Однокопийные ортологи определяли с помощью BUSCO v5.6.1. Построены два набора данных: (1) все образцы, (2) без гибридов, геномных сборок и половых хромосом. Множественное выравнивание проводили с помощью MAFFT v7.490 (Kuraku et al. 2013) с последующей фильтрацией с использованием Gblocks v0.91b (Castresana 2000). Длина фильтрованного выравнивания составила 11067417 п.н. Филогеномные деревья реконструировали с помощью RAxML-NG v1.2.2 (Kozlov et al. 2024), модель GTGTR4 с 1000 бутстрепами. Видовое дерево строили с помощью ASTRAL-III v5.7.1 (Zhang et al. 2018) по наборам генных деревьев. Узлы видового дерева с поддержкой <70% были сжаты. Все деревья были визуализированы с помощью ETE Toolkit v3.1.2 (Huerta-Cepas et al. 2016) и укоренены на *Martes foina* (mfoi.min\_150.pseudohap2.1\_HiC, DNAZoo). Матрица генетических расстояний получена с помощью RapidNJ v2.3.3 (Simonsen et al. 2008). Анализ выполнен с использованием BuscoClade v1.7.

**Сборка митохондриальных геномов и филогенетический анализ.** Митохондриальные геномы были собраны с использованием подвыборок прочтений (Seqtk v1.4, <https://github.com/lh3/seqtk>) и программы MitoZ v3.6 (Meng et al. 2019), и дополнены общедоступными данными из NCBI GenBank (31.10.2023). Общее количество образцов – 149. Последовательности проверялись и ориентировались в Unipro UGENE v50.0 (Okonechnikov et al. 2012). Множественное выравнивание выполнено MAFFT v7.490, с фильтрацией trimAl v1.4.1 (Capella-Gutiérrez et al. 2009). Длина выравнивания до и после фильтрации составила 18050 п.н. и 15793 п.н. соответственно. Филогенетическое дерево построено с помощью IQ-TREE v2.2.0 с автоматическим выбором модели (ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017)) и 1000 ультрабыстрыми бутстрепами. Дерево было укоренено на *M. foina* (NC\_020643.1) и визуализировано в ETE Toolkit v3.1.2.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Сборки геномов и хромосомные перестройки.** В работе существенно расширена база данных по геномам хромосомного уровня подсемейства Mustelinae. Улучшенная сборка генома *M. nivalis* до хромосомного уровня полностью соответствует опубликованному кариотипу ( $2n=42$ ). Впервые полученная сборка генома хромосомного уровня тропического вида *M. strigidorsa* имеет набор хромосом  $2n=44$ , с полным соответствием синтении с *M. erminea* (Рисунок 1).



**Рисунок 1.** Синтения на макроуровне между семью видами Mustelinae и двумя видами из Lutrinae (ELUT) и Guloninae (MFOI). Хромосомы, отмеченные штрихом ('), обратно-комплементарны. Локализация центромер определена на основе анализа сравнительных карт G-окрашенных хромосом. Слияния и разделения показаны синим цветом. Инверсии длиной более 1 млн п.н. отмечены красным. Аббревиатура видов: MFOI – *Martes foina*, ELUT – *Enhydra lutris*, NVIS – *N. vison*, MSTR – *M. strigidorsa*, MERM – *M. erminea*, MNIV – *M. nivalis*, MLUT – *M. lutreola*, MPFUR – *M. putorius furo*, MNIG – *M. nigripes*.

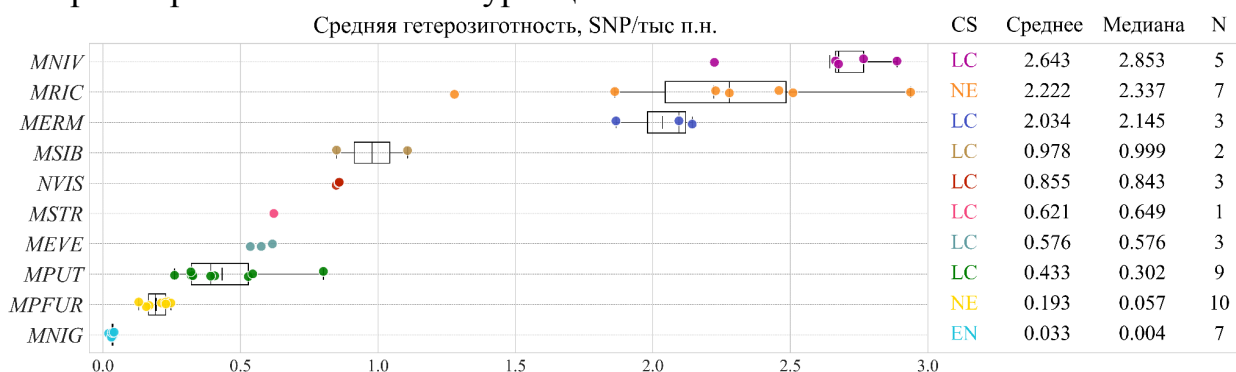
Длины сборок составляют 2.42 млрд п.н. (*M. strigidorsa*) и 2.45 млрд п.н. (*M. nivalis*) при N50 115.1 и 138.4 млн п.н., соответственно. Целостность сборок по BUSCO (mammalia\_odb10) составила 94.6 и 96%, соответственно, что сопоставимо с другими сборками Mustelinae (85.2-96.4%). Анализ синтении семи геномов Mustelinae выявил высокую сохранность хромосомных сегментов и подтвердил все ранее описанные слияния и разделения, а также перицентрическую инверсию на NVIS14 (Рисунок 1). Уточнено, что предполагаемая крупная инверсия на MNIV10 состоит из двух меньших парацентрических, обе специфичны для *N. vison*. Большинство прочих выявленных инверсий ранее не фиксировалось, так как их длина не превышает 10 млн п.н.; среди них – перестройки, различающие хорькообразных (MLUT, MPFUR, MNIG) и ласкообразных (MSTR, MERM, MNIV). Положение центромер в целом стабильно, однако в роду *Mustela* обнаружены локальные смещения (например, между гомологами хромосом MSTR5 и 12) без сопутствующих перестроек. Ранее описанные по цитогенетическим данным гетерохроматиновые плечи (например, на MNIV1 и MERM9) в текущих сборках отсутствуют.

**Размеры геномов и содержание повторов.** Для видов подсемейства Mustelinae характерны дополнительные гетерохроматиновые плечи в изначально акроцентрических хромосомах, содержание которых варьирует между видами (Graphodatsky et al. 1989). Эухроматиновая часть генома у Mustelidae стабильна (2.4-2.9 млрд п.н.), а различия в размерах генома объясняются вариабельностью содержания гетерохроматина (Graphodatsky et al. 1977). Гетерохроматин в основном состоит из tandemных повторов, трудных для секвенирования (Biscotti et al. 2015) и сборки (Sedlazeck et al. 2018). Сравнение оценок размеров геномов, ранее полученных методами цитогенетики (Graphodatsky et al. 1977), с полученными результатами анализа распределения 23-меров и оценок размера геномных сборок, показало значительные расхождения. У видов с низким содержанием гетерохроматина, таких как *M. sibirica* (13.4% ± 4.7%), сборка генома составляет 2.4 млрд п.н., и расхождение между оценками умеренное (цитогенетические: 3.0-3.1 млрд п.н. против WGS: ~2.54-2.59 млрд п.н.). В то время как у видов с высоким содержанием гетерохроматина, например *M. nivalis* (34.5% ± 3.2%, при размере сборки 2.45 млрд п.н. расхождения более выражены (цитогенетические: 4.4 млрд п.н. против WGS: 3.08-3.35 млрд п.н.). У других представителей Mustelinae, таких как *M. eversmannii*, *M. putorius*, *M. erminea* и *N. vison*, содержание гетерохроматина составляет 20.6% ± 2.2%, 22.7% ± 3.4%, 22.8% ± 3.5% и 25.4% ± 4.7%, соответственно (Graphodatsky et al. 1977). Вероятной причиной указанных расхождений является неполная сборка гетерохроматиновых регионов в существующих сборках геномов *Mustela*, что усугубляется значительными погрешностями (до 15%) при количественной оценке содержания гетерохроматина (Graphodatsky et al. 1983; Graphodatsky et al. 1989).

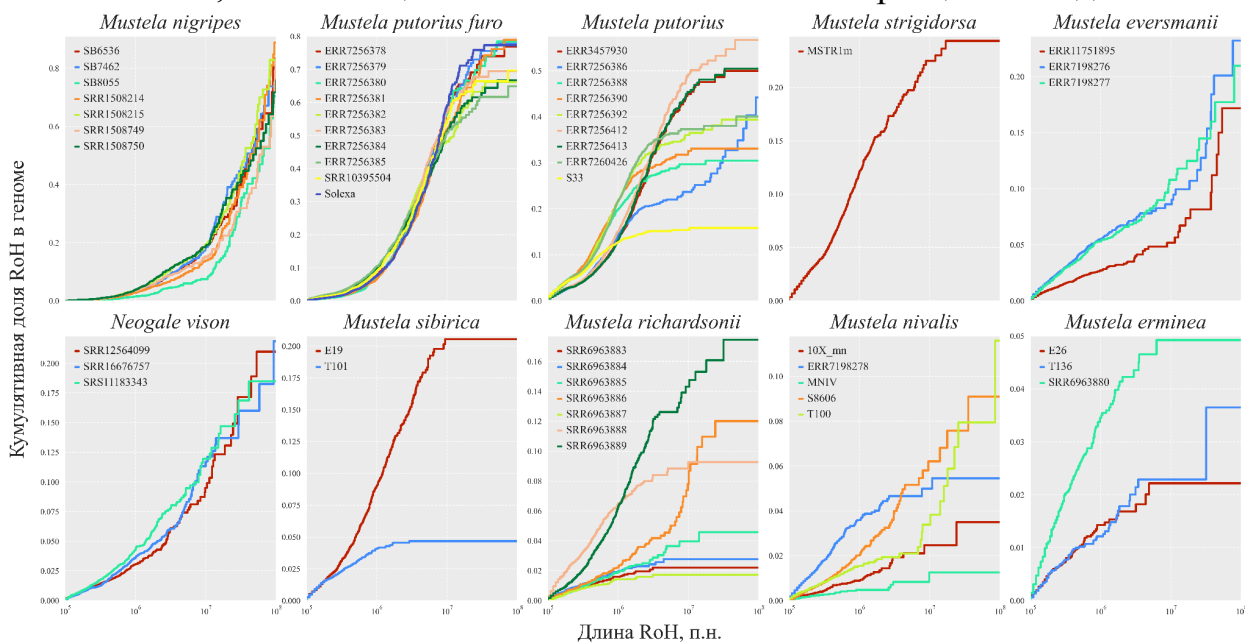
**Гетерозиготность и участки гомозиготности.** Генетическое разнообразие играет ключевую роль для жизнеспособности вида, влияя на его адаптивный потенциал и устойчивость к изменениям среды. В то же время снижение гетерозиготности может как негативно сказаться на популяциях, увеличивая частоту патогенных рецессивных аллелей, так и уменьшить или вовсе элиминировать их. Результаты анализа полногеномной гетерозиготности и гомозиготности показали значительные различия в оценках как на межвидовом, так и на внутривидовом уровнях (Рисунок 2).

Наибольшие внутривидовые различия наблюдались у *M. putorius* (0.26-0.8 SNP/тыс п.н.), *M. eversmannii* (0.54-0.62 SNP/тыс п.н.), *M. sibirica* (0.85 и 1.11 SNP/тыс п.н.), *M. richardsonii* (1.28-2.94 SNP/тыс п.н.), *M. erminea* (1.87-2.14 SNP/тыс п.н.) и *M. nivalis* (2.23-2.9 SNP/тыс п.н.). Виды с широким распространением ожидаемо обладали высокой гетерозиготностью: *M. nivalis* (2.64 SNP/тыс п.н.), *M. erminea* (2.03 SNP/тыс п.н.) и *M. richardsonii* (2.22 SNP/тыс п.н.). У этих видов гомозиготные участки (RoH) почти отсутствуют, однако у отдельных особей выявлены ультрадлинные RoH (>=10 млн п.н.), например, на chr3 образца T100 *M. nivalis* длиной 85 млн п.н. при общей длине RoH 210 млн п.н., и в образце SRR6963886 *M. richardsonii* (7 RoH, 97.4 млн п.н.). Виды *M. eversmannii* и *M. putorius* характеризуются низкой

гетерозиготностью (0.58 и 0.43 SNP/тыс п.н., соответственно) и высокой долей RoH. У *M. putorius* общая длина RoH варьировала от 15.84% до 59.28% генома (2.5 млрд п.н.), с преобладанием коротких RoH (<1 млн п.н.) в континентальных популяциях и большим числом ультрадлинных RoH у отдельных образцов из Испании и Великобритании. У *M. eversmanii* доля RoH составила 23.47-27.84% сборки, но большая часть их длины (57.35-77.9%) содержится в 9-13 ультрадлинных RoH. Оба вида сталкиваются с сокращением численности, утратой и фрагментацией среды обитания, потерей кормовой базы и конкуренцией.



**Рисунок 2.** Гетерозиготность видов подсемейства Mustelinae. Значения, приведенные в правой части рисунка, отражают среднюю и медианную гетерозиготность для каждого вида. Аббревиатура видов: MNIG – *M. nigripes*, MPFUR – *M. putorius furo*, MPUT – *M. putorius*, MEVE – *M. eversmanii*, MSTR – *M. strigidorsa*, NVIS – *N. vison*, MSIB – *M. sibirica*, MERM – *M. erminea*, MRIC – *M. richardsonii*, MNIV – *M. nivalis*. Природоохранный статус (CS): LC – вызывающие наименьшие опасения, EN – находящиеся под угрозой исчезновения, NE – не оценивались. N – количество образцов на вид.



**Рисунок 3.** Кумулятивные графики распределения RoH. Участки отсортированы по возрастанию длины. X-хромосомы исключены.

Наименьшие внутривидовые различия отмечены у *M. nigripes* (0.02-0.04 SNP/тыс п.н.), *M. putorius furo* (0.13-0.25 SNP/тыс п.н.) и *N. vison*

(0.85-0.86 SNP/тыс п.н.). Геномы *M. nigripes* и *M. putorius furo* содержат множество коротких, длинных ( $\geq 1$  млн п.н.) и ультрадлинных RoH (Рисунок 3). У *M. nigripes* RoH занимают 2.1-2.2 млрд п.н. из 2.5 млрд п.н. сборки (199-414 RoH), а 77.83-91.81% от общей длины RoH  $\geq 10$  млн п.н. У *M. putorius furo* RoH занимают 1.48-1.88 млрд п.н. сборки, или 64.9-82.05%. В случае *M. nigripes*, полученные оценки являются следствием резкого сокращения численности и выраженный эффект основателя. Вероятно, этот вид является одним из самых гомозиготных среди всех Carnivora. Менее распространенный и географически ограниченный тропический вид *M. strigidorsa* демонстрирует низкий уровень гетерозиготности (0.62 SNP/тыс п.н.) и высокую долю RoH (23.62% генома). Интересно, что при общем статусе видов Mustelinae по МСОП как вызывающих наименьшие опасения (кроме *M. nigripes*), наши геномные данные демонстрируют значительные различия в генетическом разнообразии. Это подчеркивает важность включения геномных оценок в природоохранную практику, учитывая возможную задержку между сокращением численности и потерей генетического разнообразия, а также необходимость мониторинга популяций на генетическом уровне для оценки угроз и планирования мер сохранения.

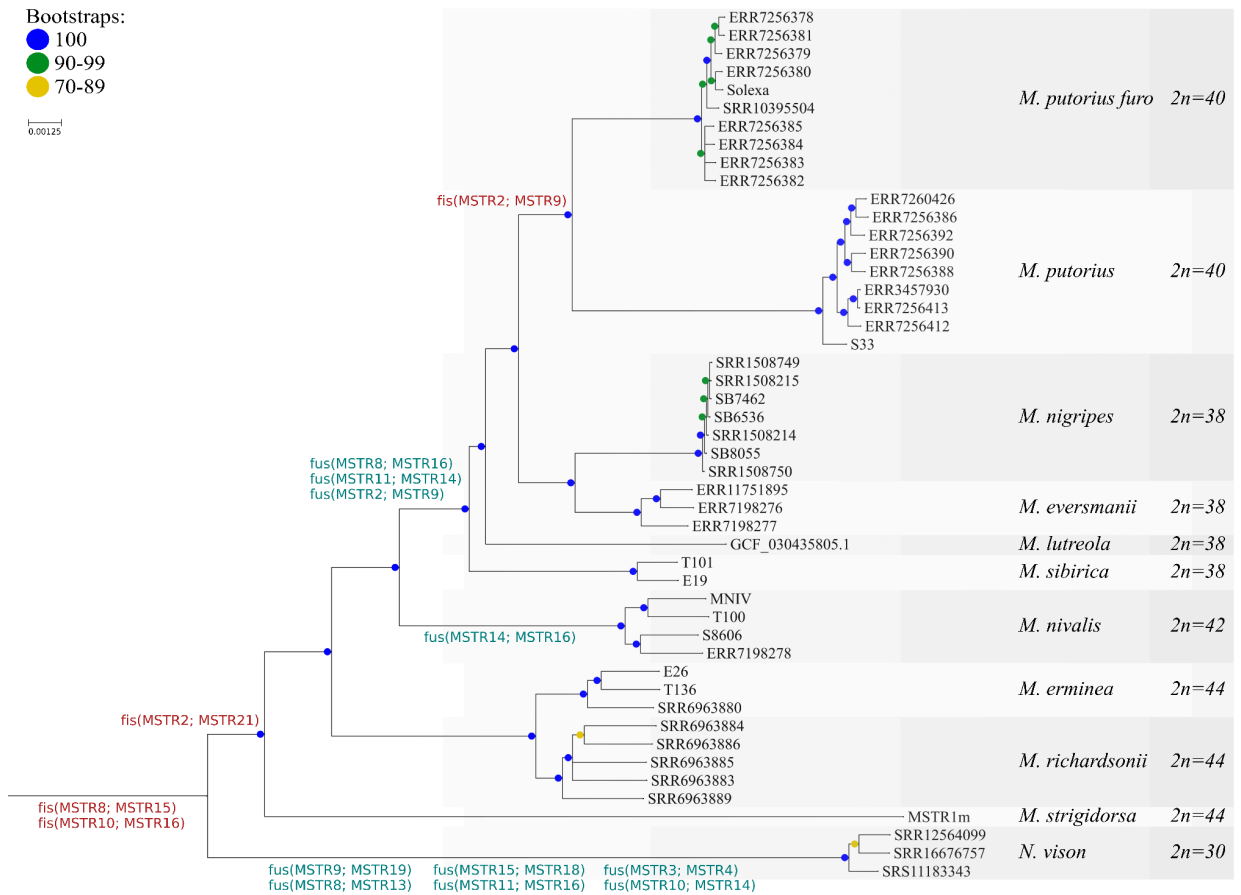
**Проверка разделения видов *M. erminea* и *M. richardsonii*, и видообразования в *M. nivalis sensu lato*.** Разделение североамериканских популяций *M. erminea* было предложено на основе митохондриальных данных, что привело к выделению трех видов: *M. richardsonii*, *M. haidarum* и *M. erminea* (Colella et al. 2018; Colella et al. 2021). Для подтверждения этого разделения и валидации общедоступных данных полногеномного ресеквенирования (*M. erminea sensu lato*) был проведен повторный анализ с добавлением двух новых образцов *M. erminea* из азиатской части ареала. Итоговый набор состоял из 10 геномов: 5 *M. richardsonii*, 3 *M. erminea* и 1 гибридный. Глобальный ADMIXTURE ( $K=2$ ) выявил два основных генетических кластера и 34.3% интрогрессии от *M. richardsonii* у SRR6963887; у остальных образцов интрогрессия по глобальному анализу отсутствовала. Локальный ADMIXTURE обнаружил низкий уровень интрогрессии *M. erminea* (1.16-2.31%) у пяти образцов *M. richardsonii*. PCA также четко разделил виды на два кластера, при этом SRR6963887 занимал положение между двумя кластерами. Образец SRR6963887, демонстрирующий высокий уровень интрогрессии, был исключен из дальнейшего анализа филогении. Результаты подтверждают обоснованность выделения *M. erminea sensu stricto* и *M. richardsonii* как самостоятельных видов.

В *M. nivalis* выявлена четкая генетическая дивергенция между европейскими и азиатскими популяциями, но без признаков полного видообразования. Сравнение внутривидовых и межвидовых генетических расстояний показало: *M. nivalis* (ср.  $1.05 \times 10^{-3}$ ) не отличается от *M. erminea* ( $1.15 \times 10^{-3}$ ,  $p=0.095$ ) и существенно ниже, чем у *M. richardsonii* ( $1.55 \times 10^{-3}$ ,  $p=0.00068$ ). Среднее расстояние между *M. erminea* и *M. richardsonii*

( $2.47 \times 10^{-3}$ ) сопоставимо с таковым между *M. evermanni* и *M. nigripes* ( $2.72 \times 10^{-3}$ ), что подтверждает их видовой статус.

**Филогения и предковый кариотип.** Впервые на основе 6596 однокопийных консервативных ортологов проведен филогеномный анализ 11 видов подсемейства Mustelinae используя конкатенированный (Рисунок 4) и коалесцентный подходы, а также филогенетический анализ на основе 149 полных митохондриальных геномов 17 видов Mustelinae. Общим для всех полученных деревьев была 100% поддержка всех межвидовых узлов, а также базальное положение *M. strigidorsa* в роде *Mustela* во всех полученных деревьях.

Видовое дерево подтверждает различие между *N. vison* и родом *Mustela* с высокой поддержкой основной топологии (pp1=1). Хотя поддержка квартета для этого разделения была несколько ниже, чем для других межвидовых узлов (q1=61.7%), она остается выше порога, который обычно считается показателем первичного топологического сигнала. Это умеренное значение может отражать внутреннее несоответствие генных деревьев из-за неполной сортировки линий или древнего потока генов на ранних этапах диверсификации Mustelinae. Тем не менее, как конкатенированный, так и коалесцентный анализ последовательно восстанавливают *N. vison* как сестринскую линию *Mustela*, подтверждая текущую таксономическую классификацию, которая признает *Neogale* отдельным родом (Patterson et al. 2025). Хотя большинство межвидовых узлов характеризовались высокой поддержкой квартета, заметным исключением является узел 9, объединяющий *M. sibirica* и *M. lutreola*, который показал заметно сниженную поддержку (q1=47.7%), что, вероятно, отражает противоречивые сигналы генных деревьев в этой кладе.

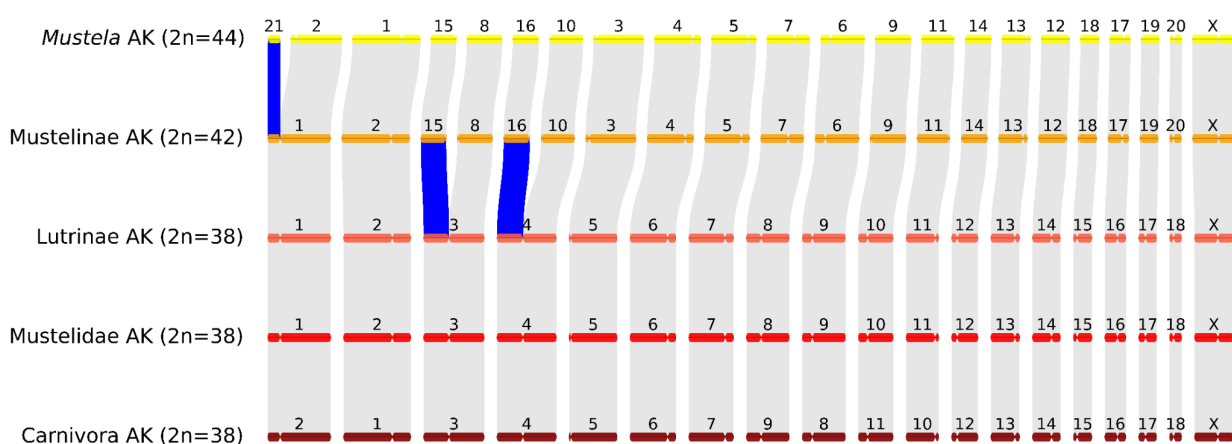


**Рисунок 4.** Филогеномное дерево, основанное на данных без половых хромосом, сборок геномов (за исключением *M. lutreola* и *M. foina*) и гибридов. Обозначения рядом с ветвями указывают на хромосомные разделения (красные) и слияния (зеленые). Транслокации представлены относительно хромосом *M. strigidorsa*. Например, *fis*(MSTR8, MSTR15) означает разделение предковой хромосомы на хромосомы MSTR8 и MSTR15, а *fus*(MSTR14; MSTR16) – слияние хромосом MSTR14 и MSTR16 в новую хромосому.

Митохондриальные деревья могут быть ненадежными в случае Mustelidae из-за активной межвидовой гибридизации (Rozhnov et al. 2013; Kinoshita et al. 2019; Colella et al. 2021; Szatmári et al. 2021; Etherington et al. 2022; Tomarovsky et al. 2025). Мы наблюдали мито-ядерное несоответствие между полученными деревьями: образец *M. putorius* ERR7260426 (BK069848) несет митохондриальный геном *M. lutreola*, а образец *M. eversmannii* ERR11751895 (PQ821906) – митохондриальный геном *M. putorius*.

Подсемейство Mustelinae демонстрирует значительную кариотипическую изменчивость от  $2n=30$  у *N. vison* до  $2n=44$  у *M. strigidorsa* и ряда других видов *Mustela*. Эта изменчивость отражает историю повторяющихся хромосомных разделений и слияний, которые внесли значительный вклад в эволюционную диверсификацию подсемейства. Результаты нашего исследования позволяют уточнить хронологию трех последних хромосомных разделений в Mustelinae (Рисунок 4). Ранее предполагалось, что разделение *fis*(MSTR2, MSTR21) произошло после

отделения рода *Neogale*, но до дивергенции *M. erminea* (Graphodatsky et al. 2002). Результаты филогеномного анализа показывают, что *M. strigidorsa* занимает базальное положение в роде *Mustela*, что сдвигает ранее предложенные сроки разделения. Дополнительная поддержка о предковых перестройках Mustelinae исходит из данных о других тропических видах *Mustela*. Например, *M. kathiah* в предыдущих исследованиях (Sato et al. 2012; Law et al. 2018), а также в нашем филогенетическом анализе, отделился после *M. strigidorsa*. Кроме того, *M. nudipes* филогенетически близок к *M. strigidorsa* (Koenfli, Deere, et al. 2008; Sato et al. 2012; Law et al. 2018), а *M. lutreolina* является еще одним тропическим видом, потенциально связанным с этой группой. Эти наблюдения подтверждают предположение, что предковый кариотип *Mustela* имел диплоидное число  $2n=42$ , а Mustelinae –  $2n=44$  (Рисунок 5).

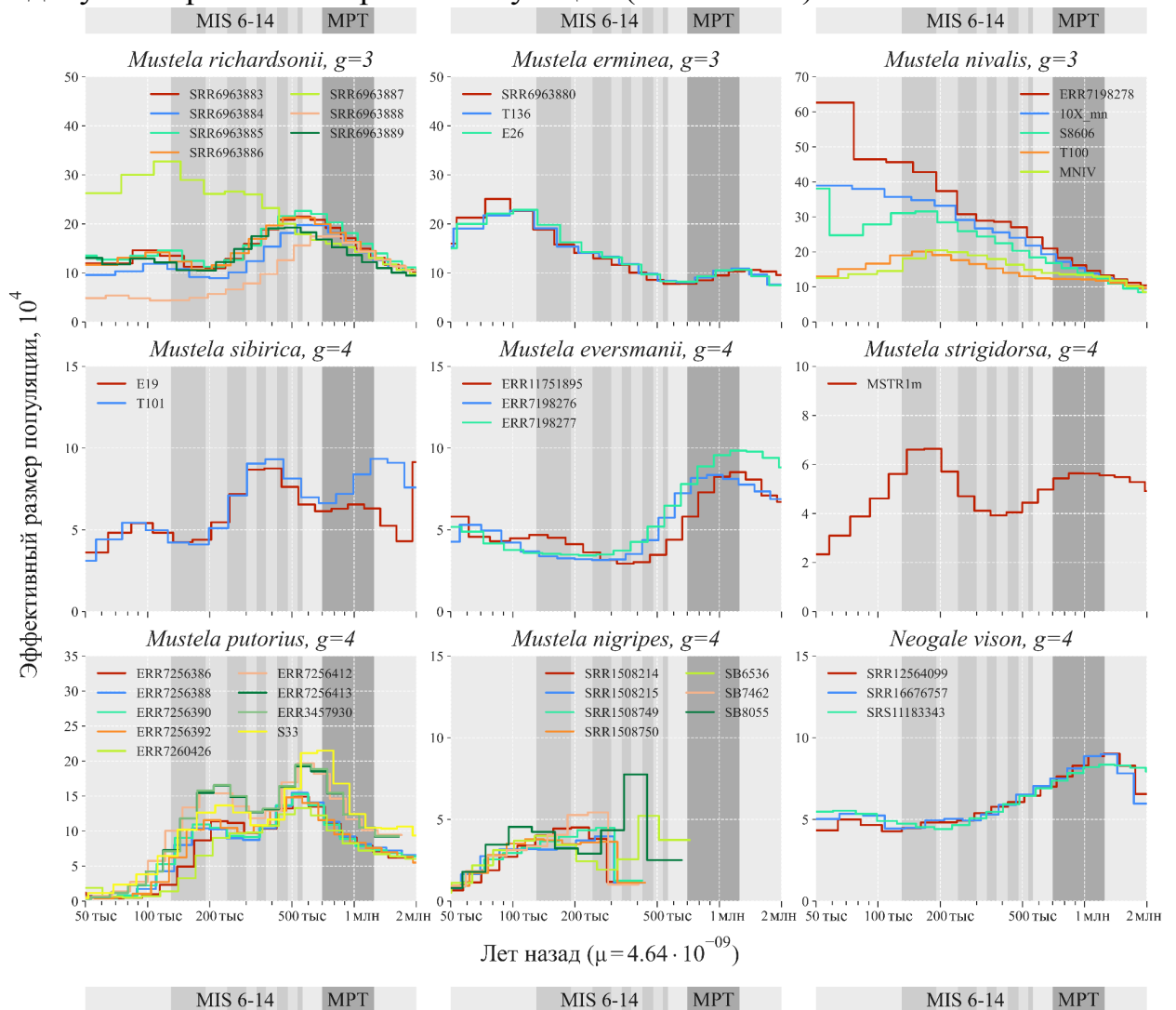


**Рисунок 5.** Схема синтении между предковыми кариотипами (AK) Carnivora, Mustelidae, Lutrinae, Mustelinae и *Mustela*. Разделения хромосом отмечены синим цветом. Нумерация хромосом для Mustelidae и Lutrinae основана на кариотипе *M. foina* (Graphodatsky et al. 2020); Carnivora – ранее предложенная номенклатура (Beklemisheva et al. 2016); Mustelinae – номенклатура *M. strigidorsa* с модификацией хромосом 1 и 2; *Mustela* – полностью соответствует *M. erminea*.

**Популяционная история.** Сравнительный анализ популяционной истории выявил значительные различия в эффективном размере популяции среди видов *Mustela* (Рисунок 6). *M. nivalis* и *M. erminea* демонстрируют либо непрерывный рост, либо стабильно повышенный  $N_e$  с незначительными колебаниями во время MIS (Marine Isotope Stages) 6-14. Эти закономерности согласуются с их устойчивостью на протяжении ледниковых и межледниковых циклов и широким географическим распространением (Sommer and Benecke 2004; Sommer and Crees 2022). Это подтверждается и палеонтологическими данными (Sommer and Benecke 2004; Marciszak and Socha 2014; Krajcarz et al. 2015; Kosintsev et al. 2016; Crégut-Bonnoure et al. 2018; Giustini et al. 2024).

Напротив, виды с более низкой гетерозиготностью, такие как *M. sibirica*, *M. eversmannii*, *M. strigidorsa*, *M. putorius* и *M. nigripes*, демонстрируют признаки повторяющихся или длительных “бутылочных

горлышек”. *M. putorius* пережил два резких снижения численности во время MIS 12 и MIS 6. Несмотря на это, он считается одним из первых видов, заново заселивших Центральную Европу после LGM, что подтверждается ископаемыми данными (Sommer and Benecke 2004; Sommer and Crees 2022). Другие виды, отобранные в Азии, демонстрируют бутылочные горлышки в начале 100-тысячелетних ледниковых циклов. Ископаемые данные по этим таксонам остаются ограниченными (Krajcarz et al. 2015; Kosintsev et al. 2016; Giustini et al. 2024; Fourvel et al. 2025). Североамериканский вид *M. nigripes* демонстрирует укороченную траекторию  $N_e$  (Derežanin et al. 2025), что согласуется с экстремальным эффектом основателя и хорошо задокументированным крахом популяции (Fricke 2015).



**Рисунок 6.** Реконструкция популяционной истории видов подсемейства Mustelinae. Параметры:  $g$  – время генерации поколений,  $\mu$  – скорость замен. X-хромосомы были исключены из анализа. Аббревиатуры: MIS (Морские изотопные стадии): 6 (191-130 тыс л.н.), 7 (243-191 тыс л.н.), 8 (300-243 тыс л.н.), 9 (337-300 тыс л.н.), 10 (374-337 тыс л.н.), 11 (424-374 тыс л.н.), 12 (478-424 тыс л.н.), 13 (533-478 тыс л.н.), 14 (563-533 тыс л.н.); MPT (Средне-плейстоценовый переход) – 1.25-0.7 млн л.н.)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведен комплексный анализ подсемейства Mustelinae на полногеномном уровне. Выявлены значительные меж- и внутривидовые различия по гетеро- и гомозиготности. *M. evermannii* демонстрирует низкое геномное разнообразие в азиатской части ареала и снижение численности в Европе и России (где сосредоточена большая часть мировой популяции). У *M. putorius* обнаружены признаки упадка численности, роста инбридинга и низкого разнообразия, несмотря на не угрожаемый природоохранный статус. Быстрое сокращение популяций с изначально высокой гетерозиготностью может привести к накоплению патогенных мутаций из-за снижения эффективности очищающего отбора, в отличие от видов с исторически низким генетическим разнообразием. Филогеномный анализ рода *Mustela* уточнил эволюционные связи. Ядерные и митохондриальные данные в целом совпадают, но выявлены расхождения, вероятно связанные с межвидовой гибридизацией. Подтверждено разделение *M. richardsonii* и *M. erminea*, но не получено данных о видообразовании в пределах *M. nivalis* при наличии географической дифференциации. Популяционная история показала разные траектории изменений эффективной численности, связанные с климатическими событиями плейстоцена: у *M. nivalis* и *M. erminea* происходили расширения ареала, у *M. sibirica* и *M. strigidorsa* – сокращения. Перспективными направлениями являются изучение внутривидовой структуры, генетического разнообразия и разработка стратегий охраны.

## ВЫВОДЫ

1. Виды рода *Mustela*, включенные в исследование, демонстрируют высокую вариабельность в оценках полногеномного генетического разнообразия как на межвидовом уровне, так и между образцами одного и того же вида, отобранными из разных частей ареала.
2. Низкие оценки уровня гетерозиготности в комбинации с протяженными участками гомозиготности у видов с продолжающимся снижением численности, таких как степной (*M. evermannii*) и лесной (*M. putorius*) хорьки, указывают на необходимость регулярного мониторинга генетического разнообразия как на глобальном, так и на локальном уровне, для своевременного предупреждения возможных рисков развития инбредной депрессии.
3. Топологические несоответствия между филогеномным и филогенетическим деревьями указывают на недостаточность использования митохондриальных данных для целей таксономического разграничения видов, особенно в такой группе как Mustelinae, для большинства видов которой характерна межвидовая гибридизация.
4. Филогеномный анализ показал базальное положение редкого и малоизученного южноазиатского вида белополосой ласки (*M. strigidorsa*) в роде *Mustela*.
5. Среди последних трех событий разделения хромосом в подсемействе Mustelinae, два разделения произошли на ранних этапах радиации подсемейства, а третье произошло после дивергенции рода *Mustela* от рода

*Neogale*, но до диверсификации всех современных видов *Mustela*. Подтверждается гипотеза о предковом кариотипе подсемейства Mustelinae с  $2n=42$ , и рода *Mustela* с  $2n=44$ .

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Totikov, A. A.**, et al. Comparative genomics and phylogenomics of the Mustelinae lineage (Mustelidae, Carnivora). *Genome Biology and Evolution*. 2026. DOI: 10.1093/gbe/evag014. Q1, IF=3.3;
2. Kliver, S.; Houck, M.L.; Perelman, P.L.; **Totikov, A. A.**, et al. Chromosome-length genome assembly and karyotype of the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Journal of Heredity*. 2023 Aug 23;114(5):539-548. DOI: 10.1093/jhered/esad035. Q1, IF=2.5;
3. **Тотиков, А. А.**, и др. Обзор методов реконструкции демографической истории популяций в природоохранной биологии. *Экологическая генетика*. 2023;21(1):85–102. DOI: 10.17816/ecogen120078; Q4, IF=0.2;
4. **Totikov, A. A.**, et al. Chromosome-Level Genome Assemblies Expand Capabilities of Genomics for Conservation Biology. *Genes*. 2021; 12(9):1336. DOI: 10.3390/genes12091336. Q2, IF=2.8;

Тезисы конференций:

1. **Тотиков А. А.** и др. (2024). Сборка генома обыкновенной ласки (*Mustela nivalis*) на уровне C-скаффолдов хромосомной длины. Четырнадцатая международная мультikonференция. Тезисы докладов. Новосибирск, ИЦиГ СО РАН, 2024, 2372 с, ISBN 978-5-91291-067-8, с. 180-185. DOI: 10.18699/bgrs2024-1.3-06;
2. **Тотиков А. А.** и др. (2023). Оценка уровня гетерозиготности представителей рода *Mustela*. Материалы Международной конференции “Хромосома-2023”. DOI: 10.25205/978-5-4437-1514-8;
3. **Totikov A. A.** et al. (2021). Reconstruction of the demographic history for three populations of the least weasel *Mustela nivalis*. Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB-2021). ISBN: 978-5-901158-32-6.