

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Тотикова Азамата Альбертовича

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

представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.7 — Генетика (биологические науки)

в диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01)

при ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН»

Актуальность исследования.

Семейство Mustelidae объединяет большое количество преимущественно небольших хищных млекопитающих, обладающих высокой экологической пластичностью. В этом семействе особо выделяется род *Mustela*, представители которого находят широкое применения в разных сферах деятельности человека: от меховой промышленности до модельных организмов. До недавнего времени, классификация и изучение разнообразия видов рода *Mustela* было основано на описании морфологических признаков, однако такие работы испытывали ряд сложностей из-за высокого полового диморфизма, возрастной изменчивости и межвидовой гибридизации. Большой прогресс в этой сфере был связан с использованием методов цитогенетики и высокопроизводительного секвенирования, что привело к пересмотру традиционной классификации.

Тем не менее, возможности для исследований серьёзно ограничены недостатком имеющихся геномных данных. Для двенадцати видов рода полностью отсутствуют полногеномные данные и лишь для единичных видов этого многочисленного рода имеются результаты ресеквенирования. Таким образом, неполнота геномных данных не позволяет в полной мере описать как филогенетические отношения между видами рода *Mustela* и этого рода внутри семейства, так и их генетическое разнообразие, имеющих большее значения в природоохранной биологии и связанных с ней отраслями экономики. Данная работа в значительной мере закрывает этот пробел, благодаря произведённым в ней ресеквенированиям особей разных видов рода *Mustela*, созданию сборок геномов хромосомного уровня для новых видов и полному анализу филогенетических отношений с учётом межвидовой гибридизации.

Структура диссертации.

Диссертационная работа Тотикова А. А. изложена на 204 страницах и имеет следующую структуру: состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа содержит 28 рисунков, 3 таблицы и 18 приложений. Материал изложен ясно и четко, воспринимается легко. Список литературы включает 335 источников. Во введении описана актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая ценность работы. Перечислены положения, выносимые на защиту, апробация работы, личный вклад соискателя, публикации по теме работы, благодарности.

Глава обзор литературы преимущественно посвящена общему описанию кунных, их распространению, текущему природоохранному статусу, устоявшейся филогении и эволюционной истории. Большое внимание автором уделяется вопросам генетического разнообразия в контексте сохранения вида. В условиях изменяющихся природных условий, высокое генетическое разнообразие обеспечивает адаптивность вида к изменяющимся условиям среды, как следствие, оценка и мониторинг генетического разнообразия является одной из важнейших задач природоохранных исследований. Традиционно, природоохранная биология придерживается концепции нейтрального генетического разнообразия для сохранения адаптивной способности вида и его численности. Тем не менее автором подчёркивается, что связь между стабильностью популяций и генетическим разнообразием не является настолько прямым. Хотя для многих видов сокращения генетического разнообразия и эффективной численности популяции приводит к инбредной депрессии, для ряда видов, например, островной лисы и бурой гиены, такого эффекта не наблюдается. В этом отношении особый интерес представляют разные виды подсемейства *Mustelinae*, поскольку среди видов этого семейства наблюдается большой разброс как по природоохранному статусу, так и по генетическому разнообразию, при этом такие различия наблюдаются даже в пределах разных популяций одного вида. Для видов с широким ареалом, таких как *M. eversmannii*, *M. erminea* и *M. nivalis* оценки гетерозиготности и численности популяции осложняется отсутствием геномных данных для многих регионов.

В главе «Материалы и методы» детально описаны все источники используемых в работе данных. Чётко указано, какие данные из биологических образцов и указано их происхождение, а какие взяты из открытых баз данных. Методика сборки геномов *de novo* или их улучшение подробно описана для каждого вида. Перечислены биоинформатические инструменты, используемые для характеристики эволюционной истории видов и их филогенетического положения. Детально описаны как используемые параметры, так и процедура подготовки данных и обработки полученных результатов.

Раздел «Результаты» можно разделить на несколько основных частей. В первой части была проведена сборка геномов *M. nivalis* и *M. strigidorsa* с помощью данных Hi-C и программы Juicer до хромосомного уровня. С помощью программы BUSCO была подтверждено высокое качество и полнота полученных сборок. С использованием парных полногеномных выравниваний для указанных выше видов была введена номенклатура хромосом, в соответствии с *M. erminia* и проведено описание хромосомной эволюции для видов подсемейства Mustelinae. Показано соответствие результатов, полученных на хромосомных сборках, ранее опубликованным цитогенетическим исследованиям.

Во второй части работы эти сборки были добавлены к имеющимся в открытом доступе и была проведена оценка уровня гетерозиготности и содержания протяженных участков гомозиготности для 10 видов рода *Mustela*. В первую очередь автором было проведено исследование качества данных полногеномного ресеквенирования, как полученных в этой работе, так и доступных из открытых источников. На этом этапе была проведена очистка от низкокачественных данных, что позволяет повысить достоверность последующих этапов исследования. Тем не менее, в оставшихся образцов всё равно обнаруживаются аномалии при анализе распределения 23-меров в виде дополнительных пиков, что может указывать на контаминацию, наличие длинных дублицированных регионов или гибридное происхождение образцов. Последующие проверки позволили отвергнуть предположение о контаминации образцов чужеродными ДНК. Последующий анализ показал высокий разброс уровня гетерозиготности между исследуемыми видами: так разница между *M. nigripes* и *M. nivalis* по количеству SNP на тысячу п.н. оказывается почти стократной. При этом проанализированы не только средние по геному значения, но и каждая хромосома по отдельности, а также локальное распределение.

В третьей части работы проведено построение филогеномных деревьев по ядерному и митохондриальному геному, и их последующее сравнение. В первую очередь была проведена проверка разделения видов *M. erminia* и *M. richardsonii*, которые относительно недавно были выделены из комплекса *M. erminea sensu lato*. Поскольку предыдущее исследование было проведено на основе митохондриального генома, автором было решено его повторить, но с использованием полногеномных данных и с добавлением образцов из азиатской части ареала исследуемых видов, собранных в этой работе, и которые ранее не были рассмотрены. Для исследуемых образцов видов была дополнительно проведена проверка на недавние события гибридизации с помощью методов ADMIXTURE и PCA. Благодаря этому удалось выявить образец со значительным объёмом интрогрессии, в следствии чего он был исключён из последующего анализа. Проведённое автором исследование позволило на полногеномных данных подтвердить разделение видов *M.*

erminia и *M. richardsonii*. Филогеномные деревья для вида подсемействе Mustelinae на основе ядерного генома были построены двумя независимыми подходами: коалесцентным и конкатенированным на основе метода ML. Высокое совпадение топологии деревьев, построенных разными методами и на основе разных геномных данных, показывает высокую устойчивость полученных результатов. Филогенетические деревья построенные на основе полных митохондриальных геномов показало высокое согласование топологии с топологией по ядерному геному, за исключением отдельных образцов, что может указывать на недавнее событие гибридизации. Кроме этого выявлено сложная внутривидовая структура, что может указывать на существование отдельных подвидов.

Четвёртая часть работы посвящена реконструкция демографической истории для видов подсемейства Mustelinae и оценка эффективной численности с использованием PSMC. Показаны закономерности в изменения эффективной численности популяций между разными видами и регионами. Для видов с высокой гетерозиготностью – обыкновенной ласки и горностая – показано стабильный рост эффективной численности популяции практически на всём периоде реконструкции популяционной истории. Для видов с низкой гетерозиготностью, таких как *M. putorius* и *M. nigripes*, показано устойчивое снижение эффективной численности и прохождение «бутылочных горлышек» в последние несколько сотен тысяч лет, при этом для *M. nigripes* не удаётся реконструировать историю глубже 350 тысяч лет, что может быть связано с эффектом основателя и крайне низким генетическим разнообразием.

В разделе «Обсуждение» автор обобщает полученные результаты по каждой части работы и проводит их сопоставление с литературными данными. Отмечается, что для ряда видов, таких как *M. evermannii* и *M. putorius*, причины сокращения численности остаются не ясны, и, по всей видимости, являются не только и не столько следствием негативного влияние человека через разрушение привычных природных ландшафтом, охоту и фрагментацию ареала. Такие факторы как межвидовая конкуренция и гибридизация с другими видами. Поднимается вопрос о соответствии оценкам благополучия видов согласно МСОП и реальному риску вымиранию, так как эти оценки не учитывают генетическое разнообразие вида, которое может в долгосрочной перспективе нивелировать усилия по его сохранению.

В разделе «Заключение» даётся общее заключение, содержащее концентрированное изложение сути работы.

Замечания.

Основные замечания относятся к иллюстративному материалу. На ряде рисунков надписи трудночитаемые, некоторые рисунки — перегружены подробностями.

Большинство подписей на рисунках англоязычные, присутствуют технические подписи, не несущей целевой информации (например, Рисунок 10: "BUSCO v5.5.1: mammalia_odb10.202401-08").

Имеется вопрос и к содержательной части работы. В разделе 3.3 указывается, что одной из причин аномалий на графиках распределения 23-меров могут быть высокая гетерозиготность образца и/или гибридизация. Возникает вопрос, подтверждается ли имеющимися у автора данными это предположение или причина аномалия так и осталась неясной?

Несмотря на возникшие замечания диссертационная работы Азамата Альбертовича заслуживает высокой положительной оценки.

Заключение.

Диссертация Азамата Альбертовича является завершённое и хорошо продуманное научно исследование. Значимость полученных результатов, обоснованность сделанных выводов. Работа выполнена на высоком научном уровне и полностью соответствует требованиям пункт 9 «Положения о присуждения учёных степеней» от 24 сентября 2013 года №842 (в текущей редакции), а её автор, Тотиков Азамат Альбертович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 — генетика.

Официальный оппонент:

младший научный сотрудник

лаборатории геномных технологий для медицинской генетики

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Федеральный исследовательский центр

Институт цитологии и генетики

Сибирского отделения Российской академии наук»

(ИЦиГ СО РАН)

кандидат биологических наук


Нуриддинов Мирослав Абдурахимович

*Жуков
Ученого
Орлова*



Нуриддинов завершено
ИЦиГ СО РАН, 10/04

20.04.2028