

## ОТЗЫВ

### Официального оппонента на диссертацию

#### Комаровой Валерии Александровны

«Микроэволюционные процессы на выраженном высотном градиенте в горных тропиках на примере крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l.»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.12 – Зоология

Диссертация В.А. Комаровой изложена на 234 страницах и имеет традиционную структуру. Она состоит из Аннотации, Введения, пяти основных глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение). После следуют Выводы, Благодарности, Список публикаций, Список цитируемой литературы и Приложения.

Каждый раздел диссертации и замечания к нему будут рассмотрены подробно.

Во **Введении** автор обосновывает актуальность работы, ставит цели и задачи исследования. Надвидовой комплекс крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus sensu lato*, населяющий уникальное Эфиопское нагорье, является перспективной модельной группой для исследования различных микроэволюционных процессов, поскольку виды заселяют экологически различающиеся пояса единого горного массива. Интересно также и то, что эндемичные эфиопские виды *Lophuromys* морфологически более разнообразны, чем виды рода, населяющие другие регионы Африки. Валерия Александровна в своей диссертации проверила на качественно новом уровне гипотезу присутствия ретикулярных процессов в эволюции эфиопских *Lophuromys*, выдвинутую ранее на ограниченном материале и с использованием отдельного небольшого числа генетических маркеров.

**Глава 1 Обзор литературы** занимает 55 страниц, она написана очень подробно и информативно, хорошим языком. Автор вдумчиво и подробно рассматривает связанные с темой работы фундаментальные эволюционные вопросы.

Много внимания уделено понятиям «вид» и «видообразование». Описана трансформация концепции классического дарвинизма о дивергентном характере эволюции в концепцию сети, содержащей множество горизонтальных связей, так называемых ретикулярных процессов, под которыми подразумевается горизонтальный перенос генов и гибридизация.

Автор фокусирует внимание на эволюционной роли межвидовой гибридизации и связанным с ней феномене адаптивной интрогрессии ДНК у млекопитающих, его встречаемости и возможном эволюционном значении в контексте адаптации животных к обитанию в условиях гипоксии и гипотермии.

В Обзоре рассказано, почему Эфиопское нагорье является уникальным природным очагом формирования эндемичной флоры и фауны. Это связано со сложным взаимодействием рельефа, длительной географической изоляции нагорья от других частей Африки, климатической истории и экологии. В итоге в Эфиопии обитает 311 видов млекопитающих, 55 из которых эндемичны, подавляющую часть эндемиков - грызуны.

#### **К Главе 1 есть лишь незначительные замечания.**

На странице 34 упоминается серна *Rupicapra rupicapra tatrlica*, которую автор называет "татрской", но чаще её называют "татранской".

На стр. 56 страна Бурунди перечислена 2 раза (строки 11-12).

На Рисунке 2 (и на других картах Эфиопии в работе) не приведен масштаб и не указан север.

На Рисунке 5 не указан автор фото или источник цитирования. В качестве пожелания хотелось бы увидеть фотографии и/или рисунки каждого из видов, может быть, их черепов, поскольку автор многократно пишет о существующих морфологических различиях. Читатель может сравнить лишь три вида, показанные вместе на Рисунке 5.

**Глава 2 Материалы и методы** занимает 32 страницы.

Для выполнения работы был использован обширный фактический материал, собранный в течение 25 лет большой командой исследователей. Диссертант принимал участие в сборе данных лишь в течение одного полевого сезона в 2020 году. Объем исследованного материала более чем солидный, использовано 814 экземпляров эфиопских *Lophuromys* из 26 локалитетов (не вполне удачно на мой взгляд называемых автором «локальностями»).

Лабораторная работа и обработка материала были выполнены преимущественно Валерией Александровной лично или с её активным участием. Для разных разделов молекулярно-генетического анализа были отобраны суммарно 322 образца. Очень важно, что информация об использованных для прочтения разных фрагментов генома пробах представлена в диссертации в Приложении (Табл. П1). Применяли как «классический» метод секвенирования ДНК по Сэнгеру, так и современные методы высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

Для филогенетических построений автор использовал различные геномные маркеры и подходы к их обработке. В качестве маркера митохондриальной ДНК взят традиционный ген цитохрома b (*cytb*), из ядерной ДНК – два общепринятых экзона (IRBP и GHR) и два менее известных интрона (WLS-7 и DHCR24-7). Конкатенат из четырех ядерных маркеров общей длиной 2409 п.н. был получен для 54 особей. Выравнивание для исследования гаплотипов *cytb* у 200 особей было выполнено по фрагменту длиной 685 п.н. Филогенетический анализ по полным последовательностям 1140 п.н. сделан для 121 особей.

Наиболее впечатляющий раздел методов рассказывает о прочтении 40 полных митохондриальных геномов от всех видов эфиопских *Lophuromys* (от 2 до 10 для каждого вида) для экстраполяции результатов, полученных для последовательностей гена *cyt b*, на всю мтДНК.

Кроме того, с использованием популярного в настоящее время методов NGS-секвенирования с уменьшенным представлением (ddRAD-seq) была получена уникальная информация о ядерном геномном SNP-полиморфизме 209 экземпляров.

Отдельно подробно рассмотрены методы и подходы при расчетах времен дивергенции. Поскольку для *Lophuromys* отсутствуют палеонтологические данные, возраст дивергенции оценивали опосредованно, используя данные по близким видам грызунов для калибровки полученного дерева.

В Главе 2 подробно рассказано об условиях ПЦР, способах формирования выборок для разных разделов исследования, применяемых компьютерных программах и алгоритмах построения филогенетических деревьев. Автор демонстрирует отличное знание современных методов и приемов анализа нуклеотидных последовательностей, корректно применяет необходимые программы. После прочтения не остается сомнений, что по объему данных, степени методической проработки и разнообразию применяемых подходов рассматриваемая диссертация полностью соответствует самому современному мировому научному уровню.

#### **К Главе 2 есть небольшие замечания:**

В диссертации нет объяснения, почему для митохондриальной и ядерной филогении в качестве внешних групп использованы разные виды: *L. nudicaudus* и *L. ansorgei*, соответственно.

В методах в некоторых случаях не указан производитель коммерческих наборов (для Diatom DNA PCR Clean-Up, diaGene).

**Глава 3 «Результаты»** изложена на 19 страницах.

В первом разделе проеден филогенетический анализ на основе последовательностей фрагмента гена *cytb* 121 особей эфиопских *Lophuromys*, в результате были получены идентичные топологии филогенетических деревьев (ML и BL), в целом согласующиеся с результатами предыдущих исследований, выполненных на данной группе. Было выявлено от десяти до двенадцати митохондриальных линий, в зависимости от метода, которые соответствовали девяти видам, распознаваемых по ряду морфологических и кариологических признаков.

Филогенетическая реконструкция на основе полных митохондриальных геномов (37 генов от каждого из 40 экземпляров) практически не отличались от построений на основе фрагмента последовательностей гена *CYTB*.

В обоих случаях было выделено 12 хорошо поддержанных митохондриальных линий, соответствующих девяти выделяемым в настоящее время видам эфиопских *Lophuromys*. Три вида оказались полифилетичными, поскольку распались на две глубоко дивергировавшие митохондриальные линии (*L. melanonyx*, *L. simensis*, *L. brunneus*).

Результаты филогенетического анализа на основе ядерных маркеров также показали четкую филогенетическую структуру с разбиением на девять основных филогенетических линий, соответствующих девяти эфиопским видам *Lophuromys*. Для построений использовали отдельно конкатенат 4 ядерных маркеров и конкатенат из 71341 SNPs, полученных методом ddRAD-seq. Интересно, что, как и в случае с митохондриальной ДНК, оба метода дали крайне сходные результаты.

Наглядным и интересным на мой взгляд разделом результатов исследования представляется определение видовых границ разными методами (рисунок 11). В отличие от митохондриальной, ядерная топология дерева хорошо согласовалась с ранее известными хромосомными данными, показывая четыре хорошо разрешенные монофилетические клады, объединяющие виды с одинаковым диплоидным набором хромосом ( $2n = 54, 60, 68, 70$ ). При этом несоответствие филогений было выявлено в характере взаимоотношений между видами внутри 68- и 70-хромосомных групп.

Поскольку были выявлены несоответствия филогений, построенных на основе мтДНК и яДНК выражающиеся в несоответствии между отдельными линиями мтДНК и ddRad-кладами трех полиморфных по мтДНК видов, автор предположил существование в эволюционной истории эфиопских *Lophuromys* как древних событий интрогрессии чужой мтДНК (в парах видов *L. menageshae* — *L. simensis*, *L. menageshae* — *L. melanonyx* и *L. flavopunctatus* — *L. brunneus*), так и относительно недавних (в парах видов *L. menageshae* — *L. simensis* и *L. flavopunctatus* — *L. brunneus*).

Было проведено молекулярное датирование дивергенции видового комплекса на основе как ядерной, так и мтДНК. Финальные топологии деревьев в \*BEAST показали, что его отделение произошло во второй половине плейстоцена (1.1 млн лет назад) с последующим разделением на четыре группы с разным хромосомным набором. Последующие радиации продолжались вплоть до позднего плейстоцена, когда произошло разделение самых молодых видов. Митохондриальное дерево свидетельствует, что 1.4 млн лет назад от общего предка обособилась линия *L. chrysopus*, не связанная с межвидовой митохондриальной интрогрессии. Затем между 0.5 и 0.8 млн лет назад возникли линии мтДНК, вовлеченные в события межвидовой гибридизации. Последняя радиация гаплогрупп 0.1–0.2 млн. лет назад разделила линии, вовлеченные в интрогрессию мтДНК внутри групп видов с  $2n = 68$  или  $2n = 70$ .

### **Замечания к Главе 3.**

Автор анализирует полученные митохондриальные линии, их географическую приуроченность и структуру. Однако в тексте работы отсутствует информация о количестве выделенных гаплотипов. На Рисунке 9 представлена медианная сеть гаплотипов. На рисунке показаны 110 гаплотипов, что достаточно много, учитывая, что анализировали 200 последовательность фрагмента цитохрома б. Высокий полиморфизм, на мой взгляд, заслуживает более пристального внимания. Полезным было бы включение в текст работы таблицы с информацией как по числу выявленных в пределах каждой митохондриальной линии гаплотипов, так и со статистикой по нуклеотидному и гаплотипическому разнообразию.

В подписях к Рисункам 8,9,10 следовало указать длину гена 1140 п.н., чтобы не возникало путаницы с данными по фрагменту гена длиной 685 п.н.

В подписи к Рисунку 10 также следовало указать использованную длину мтДНК, поскольку из методов мы узнали, что для построения дерева контрольный регион был удален.

### **Глава 4. Обсуждение** занимает 30 страниц.

В данной главе обсуждаются филогенетические взаимоотношения и видовое разнообразие крапчатых жестковолосых мышей в свете молекулярно-генетических исследований. Поскольку автор подтвердил существование девяти самостоятельных видов эфиопских *Lophuromys*, используя последовательности цитохрома б и полных митогеномов, четырех ядерных фрагментов, а также набор однонуклеотидных полиморфизмов, полученных методом ddRAD секвенирования. Приводится ревизия видов, включающая экологические особенности и уточненные автором и его коллегами ареалы, обсуждается его филогенетическое положение.

Далее автор диссертации рассуждает об адаптивной радиации видового комплекса в среднем плейстоцене и следах разновременных ретикулярных процессов, а также об возможных эволюционных сценариях предполагаемой митохондриальной интрогрессии.

### **Вопросы к Главе 4:**

Автор много внимания уделяет формированию ареалов и изолирующей роли Рифтовой долины. Вопрос, который не был обсужден в работе, есть ли синантропные виды среди *Lophuromys*? Поскольку Эфиопия – густонаселенная страна, человек мог бы не только разрушать местообитания, способствуя фрагментации ареалов и вымиранию, но и расселять не самые высокогорные виды в новые места вместе со своими деревнями.

По какой причине все наблюдаемые признаки интрогрессии трактуются как исторические? Создается впечатление, что автор допускает возможность современной гибридизации, но прямо не говорит о ней. На стр. 137-138 сказано «*Ретикулярная эволюция, по-видимому, сопровождавшая адаптивную радиацию эфиопских Lophuromys..., имела место в середине плейстоцена и продолжается до настоящего времени*». Стр 108 «*Во-первых, все особи L. simensis из Национального Парка Борена Сэнт и Комбольчи несут мтДНК, практически полностью совпадающую с таковой у L. menageshae. Во-вторых, у некоторых особей L. brunneus из леса Белетта было обнаружено наличие одного и того же гаплотипа мтДНК, принадлежащего линии 'flavopunctatus'.*» Хотелось бы знать у какого именно числа животных выявлены совпадающие гаплотипы? Из текста диссертации мы узнали, что семь из девяти эфиопских видов обитают в условиях локальной симпатрии, что создает потенциальные возможности для современной гибридизации. Грызуны зачастую ведут скрытный образ жизни, но возможно за 25 лет исследований были зафиксированы случаи современной гибридизации, например, на границах ареалов?

Стр. 143. Нет пояснения, что значит «N-mt генов».

**Глава 5 Заключение** на двух страницах доступным языком обобщает наиболее значимые результаты диссертации.

**Список литературы** содержит 434 источника 24 русскоязычных и 410 источников на английском языке.

**Приложение** содержит 4 таблицы с характеристиками использованных для диссертации образцов и номерами использованных сиквенсов и 6 рисунков (в автореферате ошибочно указано что в Приложении только 4 рисунка).

Все сделанные замечания носят рекомендательный характер и не снижают крайне высокой ценности работы. Диссертация написана отличным литературным языком, не содержит опечаток или несогласованных предложений, хорошо читается, несмотря на большой объем, и содержит множество новых достоверных данных. Несмотря на сложность темы, Валерия Александровна применяет широчайший арсенал методов для планомерного решения поставленных научных задач.

Без сомнений диссертационная работа Комаровой Валерии Александровны «Микроэволюционные процессы на выраженном высотном градиенте в горных тропиках на примере крапчатых жестковолосых мышей *Lophuromys flavopunctatus* s.l.» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор вполне заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – Зоология.

**Матросова Вера Анатольевна,**

к.б.н., научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук (ИМБ РАН). ГСП-1,

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

[v.matrosova@gmail.com](mailto:v.matrosova@gmail.com)

+7-915-231-78-88