

ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Костина Даниила Сергеевича «Генетические аспекты адаптивной радиации узкоголовых крыс рода *Stenocephalemys*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.04 – зоология и 03.02.07 - генетика

Диссертация Д.С. Костина изложена на 130 страницах и имеет традиционную структуру: состоит из Введения, четырех глав (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение), Заключение, Выводов и Списка литературы. В основном тексте имеется 21 рисунок и 4 таблицы. В конце текста работы имеется Приложение, содержащее 5 таблиц с подробными характеристиками образцов, использованных в работе. Далее каждый раздел диссертации и замечания к нему будут рассмотрены отдельно.

Глава 1 Обзор литературы занимает 32 страницы. В начале автор обосновывает актуальность работы, ставит цели и задачи исследования. Убедительно и методично доказано, что род узкоголовых крыс *Stenocephalemys* является перспективной модельной группой для изучения видообразования и возможных механизмов адаптации к условиям высокогорья, связанных с перестройкой энергетического метаболизма клетки. Автор отдельно рассматривает феномен адаптивной интрогрессии ДНК у млекопитающих, его встречаемость и возможное эволюционное значение. В целом Глава 1 написана очень подробно и информативно, есть лишь незначительные **недочеты**.

Так, на рисунке 6 с картами ареалов видов не приведено масштаба.

В разделе 1.4 описывается видовой состав, филогенетические отношения, описываются ареалы, дается экологическая и морфологическая характеристика представителей рода, но автор практически не приводит общих сведений об их биологии. Краткая информация о питании, весе, размножении, природоохранном статусе и пр. была бы очень познавательна для читателя, поскольку данные грызуны являются эндемиками Эфиопии и широкому кругу о этих животных, к сожалению, ничего не известно.

На с. 27 рассказывается об адаптивной интрогрессии: «*хотя примеров, когда накопленная за значительный промежуток времени изменчивость позволяла живым организмам совершить “эволюционный скачок” имеется более чем достаточно, адаптивная интрогрессия позволяет сократить требующееся для подобных изменений время, опять-таки благодаря фиксации уже*

апробированных отбором генетических комбинаций». Хотелось бы видеть ссылки на такие исследования.

Глава 2 Материалы и методы занимает 13 страниц. Для выполнения работы был использован обширный фактический материал, собранный при значительном участии диссертанта. Исследовано 360 особей *Stenocephalemys*, отловленных в 45 локалитетах Эфиопии. По степени методической проработки и разнообразию применяемых подходов рассматриваемая диссертация полностью соответствует современному мировому научному уровню.

Отдельный раздел посвящен расчетам времен дивергенции. Датирование основных узлов на филогенетическом дереве *Stenocephalemys* было выполнено в программе *BEAST на основании последовательностей 6 ядерных локусов 40 особей. Поскольку для узкочерепных крыс отсутствуют надежные данные по палеонтологии, автор оценил возраст дивергенции опосредованно, используя данные по близким видам грызунов для калибровки полученного дерева.

Наиболее впечатляющий раздел методов рассказывает о прочтении 23 полных митохондриальных геномов ото всех основных митохондриальных линий *Stenocephalemys* (от 2 до 9 геномов для каждой линии) для экстраполяции результатов, полученных для последовательностей гена *cyt b*, на всю мтДНК.

В конце Главы 2 автор пишет, каким способом был осуществлен сравнительный анализ нуклеотидных замен в гене цитохрома *b* в разных группах грызунов, методы окрашивания и другие детали цитогенетического анализа, а также методы компьютерного моделирования исторического распределения афро-альпийских местообитаний.

В Главе имеются **недочеты или неточности**. Так, рисунок 7 с местами сбора данных, опять же не содержит масштаба, кроме этого, к сожалению, нигде в работе не приведены их GPS-координаты, которые были бы крайне полезны для других исследователей и для определения границ видовых ареалов.

Для филогенетических построений автор использует 7 геномных маркеров, что показывает высокий научный уровень работы. В качестве маркера митохондриальной ДНК взят традиционный ген цитохрома *b*, из ядерной ДНК – два общепринятых экзона (*IRBP* и *Rag1*) и четыре интрона. 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.

Не вполне ясны длины геномных маркеров, использованные в анализе. В Таблице 1 вместе с последовательностями праймеров приведены длины

получаемых при амплификации фрагментов, однако это не значит по умолчанию, что они были получены ото всех особей. Полезным было бы привести разброс полученных значений в тексте. Так, для цитохрома *b* в Таблице 1 указана полная длина гена 1140 пар оснований. В тоже время в тексте раздела написано «Для филогенетического анализа мтДНК был амплифицирован **фрагмент гена цитохрома *b* (*cytb*)**» без указания его длины. На с.51 приводится вероятное объяснение этой ситуации: для филогенетической реконструкции были использованы полные гены *cytb* от 87 особей из 360, а оставшиеся 273 особи либо были прочитаны не целиком, либо имели неуникальный гаплотип и из финального анализа были исключены. Аналогично этому, в основном тексте автор не указал длины проанализированных ядерных фрагментов, при этом данная информация важна для оценки надежности полученных результатов. Вероятно, что сведения следует брать из Таблицы 1, однако при сложении длин фрагментов получается 3924 п.н., в то время как в работе на с.52 сказано «Полученные нуклеотидные последовательности от шести ядерных маркеров были сконкатенированы в единое выравнивание (3478 п.н.).»

Глава 3 «Результаты» изложена на 18 страницах. Реконструкция филогенетических отношений на основе последовательностей гена цитохрома *b* показала сходные топологии, в целом совпадающие с результатами ранних исследований, выполненных на этой группе. На полученном дереве выделяются четыре хорошо обособленные клады, соответствующие основным митохондриальным линиям *Stenocephalemys*: *S. albipes* был сестринским по отношению к *S. griseicauda*, а *S. albocaudata* - с еще не описанной формой видового ранга *Stenocephalemys* sp. A. Вероятно, автору предстоит описать новый вид рода.

Автор провел разные варианты анализа данных по ядерным генам. Топология итогового видового дерева, полученного при анализе шести ядерных маркеров в *BEAST обнаружила значительные несоответствия с топологией, полученной при анализе мтДНК.

При датировке узлов дивергенции в работе был получен меньший возраст дивергенции всех современных представителей *Stenocephalemys*, составивший 1,03 (0,43-1,82) млн. лет назад, что существенно меньше датировок, полученных для данного рода другими исследователями с использованием данных мтДНК. Получается, что узкоголовые крысы – это достаточно молодая группа, базальная радиация которой произошла в середине плейстоцена.

В разделе «Анализ полных митохондриальных геномов» автор приводит две филогенетические реконструкции митохондриальных линий *Stenocephalemys*,

выполненные на основе последовательностей функциональных генов (12S рРНК, 16S рРНК и 22 тРНК) и 12 белок-кодирующих генов мтДНК. Оба дерева оказались крайне похожими, что позволяет автору предполагать отсутствие значительного воздействия отбора на гены, кодирующие белки системы клеточного дыхания. Вероятно, это свидетельствует в пользу гипотезы о существовании митохондриальной интрогрессии между линиями неродственных афро-альпийских видов *Stenocephalemys*.

Крайне интересны результаты анализа распространения нуклеотидных замен (и аминокислотных остатков) в гене цитохрома *b* и их влияния на функцию белка. Автор показал, что виды узкоголовых крыс, населяющие высокогорья и местообитания, расположенные на меньших высотах, имеют разные аминокислотные остатки в 18 позиции белка. Для видов, населяющих меньшие высоты (*S. albipes* и *S. griseicauda*), характерен аминокислотный остаток фенилаланин, в то время у специализированных обитателей высокогорных местообитаний (*S. albocaudata* и *Stenocephalemys* sp. A) встречается лейцин или же изолейцин. Для того, чтобы проверить непосредственную адаптивную функцию обнаруженных замен, автор смоделировал трехмерную структуру белка *cytb* и обнаружил близость данной замены к активному центру центра белка. Вероятную роль аминокислотных замен в эффективности связывания белка цитохрома *b* с молекулой убихинона предстоит проверить.

Автор проверил и показал крайнюю консервативность 18 позиции цитохрома *b*: анализ распространения данной мутации в пределах трибы *Praomyini* не выявил случаев подобной замены среди 34 видов из 8 родов. Из всех горных грызунов лишь у альпийского сурка и у трех видов американских *Sigmodontinae* в 18 позиции белка имеют лейцин, а не фенилаланин. Интересно было бы проверить консервативность аминокислоты в 18 позиции цитохрома *b* у других видов грызунов (не высокогорных), например, населяющих степные и лесные местообитания.

Цитогенетический анализ показал высокий уровень дифференциации внутри рода. Оказалось, что обнаруженные паттерны сходства и различия хромосомных наборов лишь отчасти совпадают со структурой филогенетических отношений, полученной на основе маркеров ядерной и мтДНК. Проверку наличия гибридов целесообразно было бы провести с использованием геномных маркеров, о чем пишет и сам автор на с. 79.

Замечания к данной главе перечислены ниже.

Полезным было бы включение в текст Главы 3 таблицы с информацией как по числу выявленных в пределах каждой митохондриальной линии гаплотипов, так и со статистикой по нуклеотидному и гаплотипическому разнообразию. В тексте есть намеки на эти данные, однако точные сведения, к сожалению, в тексте

отсутствуют. Так, на с. 61 написано: «*S. albipes*, повсеместно населяющий горные леса Эфиопских высокогорий, обладает довольно широким спектром изменчивости митохондриальных гаплотипов...» «...*S. albicaudata* и *Stenocephalemys* sp. A, напротив, характеризуются относительно низким гаплотипическим разнообразием.»

В Таблице 4 приведены только простые генетические r -дистанции, хотя на мой взгляд не лишним было бы привести помимо них также двухпараметрические дистанции Кимуры (K2P).

Досадным недочетом является качество изображения на Рисунке 9, показывающим медианную сеть гаплотипов *Stenocephalemys*. Низкое разрешение не позволяет рассмотреть количество замен между разными гаплотипами, названия гаплотипов зачастую наложены друг на друга или же перечеркнуты линиями.

Глава 4. Обсуждение занимает 9 страниц. На основании полученных данных следует пересмотреть видовой состав и разнообразие и филогеографию рода *Stenocephalemys*. Так было показано, что *S. albicaudata* населяет афро-альпийские области не только на юго-восточном, но также и в некоторых областях северо-западного плато. Новые данные, полученные путем мультилокусного анализа, говорят о необходимости таксономической ревизии. Например, вид *S. griseicauda* имеет в своем составе неописанный вид-двойник *Stenocephalemys* sp. A, внутри вида *S. griseicauda* имеется значительно отличающаяся по ядерным генам линия неясного пока систематического статуса «*pseudogriseicauda*». Гаплотипы мтДНК, сходные с *S. albipes* обнаружены в популяциях «*pseudogriseicauda*» и *S. cf. ruppi*.

Далее приведен предполагаемый эволюционный сценарий адаптивной радиации узкоголовых крыс, основанный на результатах анализа ядерных маркеров. Было предположено, что единая предковая форма разделилась на две половины по обе стороны от Рифтовой долины. Популяция северо-западного плато разделилась на три части. Адаптивная радиация рода и последующая эволюция образовавшихся форм в условиях плейстоценовых климатических флуктуаций вероятно сопровождалась неоднократными вторичными контактами популяций, в результате гибридизации могла происходить интрогрессия чужеродной мтДНК, с полным замещением изначальной видоспецифичной в случае адаптивного преимущества первой.

После Главы 4 следует **Заключение**, которое на 4 страницах доступным языком обобщает наиболее значимые результаты диссертации, **Выводы** и **Благодарности**.

В Списке литературы, содержащем 7 русскоязычных и 126 англоязычных источников, присутствует некоторая небрежность оформления. Например, при цитировании эфиопских авторов (Afework Bekele, Chemere Zewdie) их имена почему-то не сокращены до инициалов, что нарушает единообразие списка литературы и приводит к нарушению порядка цитирования, так статья №9 должна быть упомянута позднее на букву “В”, поскольку Awefork это имя, а не фамилия.

Приложение содержит 5 таблиц с характеристиками использованных для диссертации образцов и номерами использованных сиквенсов.

Сделанные замечания носят рекомендательный или стилистический характер и не снижают крайне высокой научной ценности работы. Диссертация написана отличным литературным языком, хорошо читается, содержит множество новых достоверных данных. Несмотря на сложность темы, автор применяет широчайший арсенал методов для планомерного решения поставленных научных задач.

Без сомнений диссертационная работа Данилы Сергеевича Костина «Генетические аспекты адаптивной радиации узкоголовых крыс рода *Stenocephalemys*» 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.



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

+7-915-231-78-88