



В диссертационный совет
24.1.026.02
при Федеральном государственном
бюджетном учреждении науки

Зоологический институт
Российской академии наук
Совет по зоологии и гидробиологии

ОТЗЫВ

Официального оппонента Артёма Валерьевича Недолужко
на диссертацию **Ольги Васильевны Бондаревой**

**«Молекулярные адаптации грызунов к подземному образу жизни на
примере подсемейства полевочных (Arvicolinae, Rodentia)»**, представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.12. – зоология

Диссертационная работа Бондаревой О.В. является одним из научно-исследовательских проектов, выполненных лабораторией эволюционной геномики и палеогеномики Зоологического института РАН (Санкт-Петербург, Россия). Её автор освещает эволюционные взаимоотношения филогенетически независимых видов подсемейства полевочных (Arvicolinae) и проводит поиск геномных маркеров, связанных с адаптацией к подземному образу жизни. Следует высоко оценить использование в работе маркеров как ядерного, так и митохондриального геномов, что позволяет изучить эволюцию видов, учитывая потенциальную возможность межвидовой гибридизации.

В диссертации также рассматривается влияние отбора на гены митохондриального и ядерного геномов, связанные с подземным образом жизни у представителей полевочных. Известно, что митохондрии, как органеллы, функционируют в качестве клеточных «электростанций», участвуя в различных метаболических процессах, а также в клеточном дыхании. В то же время, ядерный геном содержит функциональные локусы быстрого и долговременного ответа, связанные с адаптацией к нехватке кислорода (гипоксии) и переизбытку углекислого газа (гиперкапнии).

Диссертационная работа Бондаревой О.В. посвящена изучению эволюционных процессов, происходящих в одной из наиболее интересных таксономических групп высших позвоночных животных. Грызуны являются индикаторами состояния окружающей среды и эволюционные процессы прослеживаются в них детальнее в силу относительно небольшого времени жизни одного поколения и благодаря высоким показателям эффективного размера популяции. Исследования докторанта выполнены на репрезентативной выборке видов, представляющих подсемейство Arvicolinae. При использовании разных маркеров количество включенных в анализ видов варьировало, в том числе из-за доступности генетических данных в открытых депозитариях. В частности, для анализа изменчивости последовательностей цитохрома b использовались 62 представителя Arvicolinae, в анализе белок-кодирующих генов митохондриальных геномов – 57 видов подсемейства, а при анализе последовательностей генов-ортологов, обнаруженных в транскриптомах – 18 видов.

Автор диссертации при поддержке коллег из Зоологического института РАН и других исследовательских учреждений добился впечатляющих результатов, более того, его вклад в данную работу сложно недооценить. Бондаревой О.В. проведены исследования подсемейства полевочьи направленные на анализ молекулярных маркеров, связанных с конвергентной эволюцией внутри таксона и с адаптацией к подземному образу жизни у филогенетически далеких видов. Полученные автором генетические данные представлены в виде 36 новых митохондриальных геномов и 17 транскриптомов (данные для *de novo* сборки десяти из них были сгенерированы самостоятельно).

Полученные Бондаревой О.В. результаты позволяют значительно расширить наши знания о филогении и адаптивной эволюции представителей подсемейства Arvicolinae, закладывая фундамент для последующих исследований. Данные, сгенерированные в ходе выполнения диссертационной работы, а также скрипты и программные конвейеры, написанные Бондаревой О.В. на высокоуровневом языке программирования Python и депонированные в открытые базы NCBI и GitHub, соответственно, послужат для дальнейших исследований эволюционных процессов у грызунов как в России, так и за ее пределами. Полученные результаты могут быть также использованы в курсах лекций, посвященных эволюционной геномике и зоологии как в высших учебных заведениях, так и в рамках программ дополнительного образования и программ повышения квалификации.

Важно отметить, что данная диссертационная работа в очередной раз наглядно продемонстрировала необходимость более широкого использования современных молекулярных методов, как инструментов для зоологических

исследований. Возможности этих подходов выходят далеко за пределы филогенетических реконструкций и гипотез, построенных на основе единичных маркеров ядерного или митохондриального геномов. В настоящее время перед зоологической наукой открываются перспективы изучения на молекулярном уровне функциональных адаптаций, популяционной истории и демографической структуры видов животных.

Диссертационная работа Бондаревой О.В. состоит из введения, четырёх глав (обзор современной литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение), заключения, выводов, публикаций автора по теме диссертации, списка литературы и приложений. Список литературы включает в себя 148 наименований, менее 10 % из них опубликованы в последние 5 лет, что говорит о необходимости продолжения исследований в данной тематике, учитывая ее важность при оценке молекулярных механизмов адаптации у высших позвоночных.

Во Введении обсуждается актуальность темы и степень ее разработанности, научная новизна, цели работы, её теоретическая и практическая значимость, положения выносимые на защиту, список конференций, на которых были представлены результаты работы, и публикации, включающие 7 статей из списка ВАК и международных баз Web of Science и Scopus.

Глава 1. Обзор литературы состоит из трёх разделов, детально описывающих имеющиеся в современной зоологической литературе сведения о морфологических, физиологических и молекулярных адаптациях представителей подсемейства Arvicolinae к подземному образу жизни. Также представлена информация об уровне отбора в генах митохондриального и ядерного геномов у грызунов.

Глава 2. Материалы и методы детально описывает коллекционный материал, использованный в работе, а также генетические данные, привлеченные из открытых депозитариев. Качественно описаны лабораторные методы выделения ДНК и РНК из зоологического материала, методы пробоподготовки и приготовления библиотек ДНК-фрагментов, а также секвенирование по Сэнгеру и с использованием технологии Illumina. В главе также представлено описание использованных биоинформационических программ и скриптов, написанных автором самостоятельно.

Глава 3. Результаты. Этот раздел описывает как данные филогенетических исследований отдельных генов митохондриального и ядерного геномов, так и результаты, связанные с анализом белок-кодирующих генов митохондриальной ДНК и транскриптома. Здесь также представлены данные анализа генов, находящихся под отбором в геномах представителей подсемейства Arvicolinae

приспособленных к подземному образу жизни. Кроме того, детально описаны результаты анализа частоты встречаемости несинонимичных мутаций (приводящих к замене аминокислоты в белковой последовательности) в изучаемых данных, а также поиск параллельных аминокислотных замен, направленный на описание генов, вовлеченных в адаптационные процессы.

В главе 4 Обсуждение полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты рассматриваются в свете уже имеющихся литературных данных. В частности, у представителей подсемейства Arvicolinae приспособленных к подземному образу жизни выявлено большее количество CG-нуклеотидов митогеномах, что связывается с адаптивными следами в них. Этот вопрос крайне интересен, но требует более внимательного рассмотрения в сравнении с уровнем смещения процентного состава нуклеотидов в митохондриальных геномах других таксономических групп как позвоночных, так и беспозвоночных. Порядок генов в митохондриальных геномах изучаемых видов постоянен, что не удивительно для высших позвоночных, у которых нарушения в порядке генов чаще всего связаны с ошибками при биоинформационическом анализе. В данной главе диссертации также обсуждаются обнаруженные параллельные аминокислотные замены в геномах представителей подсемейства Arvicolinae приспособленных к подземному образу жизни, в частности, в гене цитохрома b. Предполагается, что они могут иметь функциональное значение. В заключении, указывается, что полевочьи имеют во многом схожие адаптационные механизмы с другими подземными грызунами. Это касается как наличия параллельных аминокислотных замен, так и ослабления и усиления отбора в разных генах по сравнению с наземными видами.

В целом, серьёзных вопросов к результатам работы у меня нет. В то же время есть несколько замечаний, которые хотелось бы озвучить:

1. Не ясно почему для улучшения разрешения филогенетического анализа с использованием гена цитохрома b выбраны столь разнообразные по своему функционалу гены ядерного генома (*BRCA1*, *GHR*, фрагмент *LCAT*, *PT53* и другие).
2. При анализе данных секвенирования качество прочтений варьировало от 28 до 29. Обычно программы, оценивающие качество геномных прочтений, отсекают данные по определенному порогу, например, $Q>28$ или $Q>29$. Необходимо также пояснить наличие N в сборках митохондриальных геномов, учитывая высокое качество использованных прочтений.

3. При работе с музейным образцом кашмирской полёвки (*Hyperacrius fertilis*) была произведена неудачная попытка оценить процентный состав дезаминированных цитозинов в геномных прочтениях. Диссертант указывает на их отсутствие, но это не так. Коммерческий набор NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina, использованный при приготовлении ДНК-библиотек, содержит фермент урацил-ДНК-гликозилазу (UDG), который удаляет все дезаминированные цитозины во время пробоподготовки, поэтому поиск дезаминирования в геномных данных был заранее обречен. В тоже время, это никак не отразилось на самих данных (разве что размер прочтений был несколько короче, вследствие обработки UDG).
4. В диссертации присутствует множество англицизмов (например, «сиквенсы», «деление на партиции» и др.), которые с одной стороны режут глаз, с другой стороны заставляют в очередной раз задуматься о необходимости их правильного внедрения в русскоязычную научную литературу.
5. Я уверен, что рисунки и подписи к ним как в диссертации, так и в автореферате должны говорить сами за себя, не заставляя искать пояснения в тексте диссертационной работы. Следует отметить, что в публикациях по теме диссертации данная проблема решена.
6. Необходимо также отметить наличие ряда некритичных ошибок, как в тексте диссертации, так и в автореферате (например, «генный состав митохондрий» или «использование ядерных генов для анализа изменчивости гена CYTB»). Кроме того, на мой взгляд, латинские видовые названия необходимо выделять курсивом везде по тексту, в том числе, и в списке литературы.

Представленные выше замечания ни в коей мере не умаляют качества работы, проделанной диссидентом. Представленная на оппонирование диссертационная работа Бондаревой О.В. наглядно демонстрирует ее высокий уровень, как молодого и квалифицированного специалиста с большим потенциалом в эволюционной зоологии и геномике.

Диссертационная работа Бондаревой Ольги Васильевны «Молекулярные адаптации грызунов к подземному образу жизни на примере подсемейства полевочных (Arvicolinae, Rodentia)» является законченной и отвечает всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. По существу содержания и оформлению она соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения

ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Ольга Васильевна Бондарева, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12 – зоология.

Недолужко Артем Валерьевич, кандидат биологических наук (специальность – 03.00.23 – биотехнология), заведующий лабораторией палеогеномики, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования Европейский университет в Санкт-Петербурге.

28.02.2023

Подпись Недолужко А.В. звучит
Отличием от подпись крафт Миронов А.В.

