

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Новиковой Серафимы Валерьевны
«Изучение генетической адаптации в популяциях лиственницы сибирской
(*Larix sibirica* Ledeb.) с использованием данных полногеномного генотипирования»,
представленную к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

Одной из центральных проблем фундаментальных исследований биологии является адаптация живых организмов к изменяющимся условиям среды обитания. Наиболее сложными в этом плане являются древесные растения, имеющие неподвижный образ жизни, многолетний цикл развития и часто обширные ареалы. В результате приспособление к разнообразным условиям среды у них происходит не только на уровне фенотипических изменений, но и генетических. Ускоренное совершенствование молекулярно-генетических методов исследования открывает новые возможности для изучения закономерностей распределения генетической изменчивости, а также процессов поддержания равновесия в численности популяций и повышения их устойчивости. К важнейшим компонентам фитоценозов в умеренных и холодных (включая субарктический и субальпийские пояса) Северного полушария относится лиственница, значение которой особенно велико, поскольку она является самой распространенной древесной породой на всей планете, в том числе и в России. Более того, от Урала до Чукотки она образует северную границу лесов и древесной растительности. Неслучайно представители рода *Larix* Mill. отличаются значительным полиморфизмом. Использование данных полногеномного генотипирования позволяют глубже понять характер и сущность генетической адаптации лиственницы как в прошлом, так и на современном этапе в условиях заметного изменения климата в сторону его потепления.

Актуальность диссертационной работы С.В. Новиковой обусловлена возможностью изучения пространственно-генетической структуры популяций лиственницы и особенностей ее генетической адаптации с использованием современных подходов, основанных на данных полногеномного генотипирования и поиске ассоциаций между генотипом и параметрами окружающей среды (температура, осадки, высотная поясность). Актуальным является и выбор объекта исследований – лиственница сибирская *Larix sibirica* Ledeb., популяции которой имеют высокое генетическое разнообразие, а их изучение имеет важное значение с точки зрения расширения представлений о генетических основах устойчивости и выживания отдельных видов в пределах широкого ареала.

Научная новизна диссертационной работы включает как теоретические, так и прикладные аспекты. Впервые с помощью данных полногеномного генотипирования путем секвенирования ДНК ассоциированной с сайтами рестрикции эндонуклеазами (ddRADseq) проведена оценка пространственно-генетической структуры популяций *L. sibirica*, произрастающих на территории 7 регионов России (Красноярский край, Свердловская область, Республики Хакасия, Алтай, Тыва и Башкортостан, Ямало-Ненецкий автономный округ), расположенных на широте (с севера на юг) – от 66,7° до 50,3° с.ш., в долготной зональности (с запада на восток) – от 58,3° до 95,6° в.д., а также высотной поясности – от 520 до 2086 м над у.м. Получены новые данные об их генетическом разнообразии и генетической структуре. Выявлены маркеры и участки генома лиственницы сибирской, изменчивость

которых статистически достоверно связана с экологическими градиентами, ассоциированными как с широтой ее произрастания, так и с высотой над у.м. Кроме того, показана взаимосвязь между уровнем индивидуальной гетерозиготности и стабильностью прироста древесины у лиственницы, что позволяет рассматривать индивидуальную гетерозиготность как потенциальный показатель ее адаптации к условиям засухи. Обнаруженные SNP с выраженной адаптивной изменчивостью после верификации и валидации могут стать перспективными генетическими маркерами для выявления деревьев и популяций с высоким генетическим потенциалом и осуществления экологического мониторинга. В связи с этим актуальность и новизна выполненной работы не вызывают сомнения и имеют не только теоретическое, но и практическое значение.

Диссертационная работа С.В. Новиковой состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 197 работ (из них 177 – на иностранных языках), изложена на 119 страницах, содержит 12 таблиц и 30 рисунков. Имеет Приложение, представленное на 12 страницах, включающие аннотации SNP-маркеров, полученных в рамках исследования адаптации лиственницы сибирской к условиям высокогорья.

Во **Введении** автор описывает актуальность и степень разработанности темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, обосновывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту. Приводится список конференций, на которых были представлены основные результаты выполненной работы, а также список публикаций. Раздел заканчивается описанием личного вклада автора, благодарностями и перечислением проектов, в рамках которых выполнены данные исследования. В автореферате данный раздел соответствует «Общей характеристике работы».

Глава 1 посвящена обзору литературы (13 стр.) и состоит из шести разделов, весьма небольших по объему. В первом из них диссертант приводит характеристику лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb., отмечая кратко ее внешние признаки, условия произрастания и ареал. Особое внимание уделяется геному (12 млрд. п.н.), трудностям и успехам в его изучении, полученным в последние годы. Во втором разделе тезисно излагаются основы адаптивного генетического потенциала лесных древесных растений в условиях глобального изменения климата. Делается заключение о важной роли локальной адаптации популяций древесных пород в условиях умеренных и холодных широт. В третьем разделе автор останавливается на вопросах ландшафтной геномики и поиске ассоциаций на уровне геном-окружающая среда. Подчеркивается, что исследования, основанные не геномном сканировании с применением многомерных подходов, позволяют более эффективно проводить мультилокусный отбор и идентифицировать участки геномов, находящихся под действием естественного отбора, в которых локализованы гены, контролирующие процессы локальной адаптации. В четвертом разделе с названием «Дендрохронология, годовичные кольца и дендрофенотипические показатели» речь идет о важности изучения датировки годовичных колец древесины, их ширины и динамики прироста в связи с оценкой устойчивости растений к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды. В пятом разделе в сжатой форме делается акцент на дендрогеномике как новом направлении в решении проблем, связанных с динамикой границы леса, пространственно-временной структурой популяций, механизмами устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам и т.д., который

основан на использовании SNP-маркеров, полученных в ходе полногеномного генотипирования. *Шестой* раздел отражает преимущества использования высокопроизводительного секвенирования с редуцированной представленностью генома, в основе которого лежит генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) с помощью рестриктаз одновременно у множества особей.

Вторая глава, объемом 22 страницы, включает 12 разделов. *Первый* из них отражает сбор образцов (от 492 деревьев) на территории 7 регионов России. В виде отдельной таблицы приводятся географические координаты и конкретные места сбора (37 точек) образцов, их количество по регионам и аббревиатура названий. *Во втором* разделе представлены природно-климатические особенности регионов, в которых собран материал для исследований. Здесь же приводятся биоклиматические переменные (среднегодовая температура воздуха, изотермальность, температурная сезонность, средняя температура самого холодного/теплого квартала, годовые осадки, уровень инсоляции, осадки самого влажного месяца, средняя скорость ветра) и их анализ, который с помощью пакетов статистических программ, по всей вероятности, выполнен самим диссертантом. *В третьем* разделе детально описаны методы обработки кернов и результаты статистического анализа полученных показателей. *В четвертом* разделе излагаются методы выделения ДНК, подготовки ddRADseq библиотек и их секвенирования, а в *пятом* – методы их обработки. *В шестом* разделе дается расчет основных популяционно-генетических параметров – частота наиболее часто встречающегося аллеля (P), доля гетерозиготных особей в данной популяции (H_O), гетерозиготность ожидаемая при равновесии Харди-Вайнберга (H_E), оценка нуклеотидного разнообразия (P_i), индекс фиксации (прокси коэффициента инбридинга особи относительно субпопуляции) (F_{IS}) и пр. *В седьмом и восьмом* разделах приводится, соответственно, поиск корреляции между генетическими, географическими и экологическими координатами, а также между индивидуальной гетерозиготностью и дендрофенотипами. *В девятом* – поиск генетических маркеров, изменчивость которых, возможно, находится под влиянием отбора, а в *десятом* – поиск генетических маркеров адаптации, связанных с переменными окружающей среды. *В одиннадцатом* разделе изложен полногеномный поиск ассоциаций между генотипом и дендрофенотипом, а в *двенадцатом* – функциональная аннотация выявленных SNP-маркеров.

Результаты собственных исследований автора и обсуждение полученных данных представлены **в третьей главе** (52 стр.) и включает 5 разделов, каждый из которых разбит на 3 или 4 подраздела.

Первый раздел главы 3 (3 стр.) отражает обработку результатов секвенирования и генотипирование деревьев, представляющих популяции, отобранные для изучения адаптации к природно-климатическим условиям высокогорья и широтного градиента, а также для дендрохронологического анализа и изучения механизмов адаптации к условиям засухи. В результате для изучения структуры популяции, представленной 488 деревьями *L. sibirica* получен общий набор маркеров, включающий 2938 SNP. Набор данных для 231 деревьев, растущих в условиях высокогорья, состоял из более 20 тыс локусов, включающих 25 143 биаллельных SNP. В связи с изучением адаптации лиственницы к широтному градиенту для 125 деревьев обнаружено 87 тыс локусов и 47 929 биаллельных SNP. Для 136 деревьев

L. sibirica, отобранных для дендрохронологического анализа и изучения механизмов адаптации к условиям засухи, набор данных содержал 9 742 биаллельных SNP.

Второй раздел главы 3 (13 стр.) посвящен структуре популяций лиственницы и их основным популяционно-генетическим параметрам. В частности, показано, что изученные популяции, расположенные на территории Башкортостана, Свердловской области и Ямало-Ненецкого автономного округа оказались в одном кластере и дистанцировались от популяций, произрастающих на Алтае. По результатам анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) лишь 2,8% общей генетической изменчивости приходится на межпопуляционную составляющую, 15% – на межгрупповую, а 72% – на внутривнутрипопуляционную компоненту. Количественная оценка дифференциации популяций проведена на основании коэффициента F_{ST} , которая показала, что минимальные значения F_{ST} и слабый уровень генетической дистанции зафиксированы при попарном сравнении популяций SON и KAM (Республика Хакасия), а максимальные – между IVD и NBSK (Свердловская обл. и Ямало-ненецкий автономный округ, соответственно). Между другими изученными популяциями уровень дифференциации оказался промежуточным.

Анализ субпопуляционной структуры позволил выделить 3 группы: уральскую (SIB, SEV, IVD и LAB, соответственно, Башкортостан, Свердловская обл. и Ямало-ненецкий автономный округ), алтайскую (D, E и F) и сибирскую (Красноярский край, Республика Тыва и Хакасия), однако образцы выборки LAB (окрестности г. Лабытнанги, ЯНАО) занимают промежуточное положение, что соответствует также ее географическому расположению на границе между ареалами западной и восточной рас *L. sibirica*.

В третьем разделе главы 3 (12 стр.) рассмотрены результаты изучения популяций, произрастающих в условиях высокогорья, позволивших выявить 550 уникальных значимых маркеров-кандидатов, из которых 49 (по результатам использования трех методов LFMM, BayeScEnv и RDA) и 46 (четыре метода GEA, включая PCAdapt) коррелировали с факторами окружающей среды. Из 550 значимых SNP-маркеров 20 SNP располагались в кодирующих областях генов, 41 – в межгенных областях, в том числе 18 на расстоянии менее 10 тыс. н.о. от ближайшего гена. Из 67 SNP-маркеров, ассоциированных с высотой места произрастания деревьев, четыре располагаются в скаффолдах, содержащих аннотированные гены: три в межгенных районах и один SNP (LS_31130-0.0) – в кодирующей области. Краткая характеристика белковых продуктов генов, содержащих значимые SNP в кодирующих областях, позволили автору предположить их функциональную роль в адаптации к условиям окружающей среды.

Четвертый раздел главы 3 (8 стр.) касается вопроса адаптации лиственницы к природно-климатическим условиям в зависимости от широтного градиента. После визуализации методом главных компонент взаимосвязей между биоклиматическими переменными и местом произрастания деревьев обнаружено, что первая компонента описывает 61,1% вариации, связанной, в первую очередь, с показателями скорости ветра и солнечного излучения. Вторая компонента описывает 23,3% вариации, обусловленные высокими значениями годовой температуры и низкими показателями влажности.

В результате для уральских (западных) и сибирских (восточных) популяций выявлено 196 SNP-маркеров, среди которых только по пять SNP-маркеров (для каждой из популяций) коррелируют хотя бы с одним из внешних факторов среды.

Большую дифференциацию популяций по выявленным SNP автор объясняет присутствием значительного числа митохондриальных маркеров, наличие которых обусловлено материнским характером наследования митохондриального генома у лиственницы, соответствующего семенам, по сравнению с ядерными генами, переносимыми как семенами, так и пыльцой.

В пятом разделе главы 3 (14 стр.) рассматриваются вопросы, связанные с дендрохронологическими переменными, отражающими индивидуальный ответ дерева на условия засухи, полногеномный поиск ассоциаций с использованием индивидуальных дендрофенотипов, SNP-маркеры, полученные в рамках изучения механизмов адаптации к условиям засухи, а также корреляция между индивидуальной гетерозиготностью и дендрофенотипами. В частности, из 371 SNP-маркера, обнаруженных методами ассоциативного анализа, только 26 принадлежат скаффолдам с аннотированными участками генома *L. sibirica*, локализованных в основном в межгенных регионах и только пять – в кодирующих областях генов. Следует отметить, что три из них являются несинонимичными нуклеотидными заменами и приводят к изменению кодируемой аминокислоты. На основании проведенных исследований диссертант пришла к выводу, что в четырех из пяти изученных популяций за последние 30 лет (1990-2019 гг.) скорость роста деревьев уменьшалась, и объясила этот факт снижением уровня оводненности тканей, вызванной потеплением.

В **Заключении** (3 стр.) приводится краткое обсуждение основных результатов, полученных в процессе выполнения диссертационной работы. Выявление нескольких SNP-маркеров в генах-кандидатах позволили диссертанту сделать некоторые предположения о их функциональной роли в механизмах адаптации *L. sibirica* к суровым условиям произрастания. К примеру, маркер LS.28474_5984, обнаруженный у деревьев сибирской (восточной) популяции, локализованный недалеко от гена futsch-подобного белка, участвует в метаболизме азотистых соединений. Некоторые маркеры могут находиться в промоторном районе, влияя на экспрессию генов.

Диссертационная работа заканчивается **выводами**, которые подтверждены определенным количеством наблюдений и статистической обработкой. Они логически следуют из содержания диссертационной работы.

Выводимые на защиту положения убедительно доказаны и их достоверность подтверждена многочисленными статистическими методами с применением новейших программ, широко используемых для систематизации и анализа данных генетических исследований.

В **Приложении** представлены аннотации SNP-маркеров, выявленных в процессе выполнения диссертационной работы.

Основные результаты диссертации достаточно полно апробированы на международных и всероссийских конференциях и опубликованы (в соавторстве) – в рецензируемых изданиях из списка ВАК, а также индексируемых в международной базе WoS и Scopus («International Journal of Molecular Sciences» (две статьи), «Forests» и «Сибирский экологический журнал»).

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа С.В. Новиковой хорошо структурирована и изложена квалифицированным языком. Собранный материал проанализирован, выводы логически следуют

из его содержания. Вместе с тем, при прочтении диссертационной работы возникают некоторые вопросы:

1. В тексте основное внимание уделяется методам и методическим подходам, но приоритетной считается постановка задач, а потом – пути их решения. В таком случае и большинство подписей к рисункам отражали бы не «результаты анализа» методов... (см., например, рис. 6–11), а их биологический смысл.

2. Что подразумевается под выборкой: группа растений или популяция? Как определяли границы популяций внутри регионов?

3. Судя по данным диссертации, сбор образцов проводился не только в широтном градиенте (с севера на юг) с разницей $16,4^\circ$ между крайними точками, но и в зависимости от долготной зональности (с запада на восток) с разницей в $37,3^\circ$. Не исключено, что ответная реакция лиственницы в разных природно-климатических условиях различается, но какое влияние из них сильнее?

4. В работе далеко не в полной мере представлены результаты более ранних популяционно-генетических исследований, выполненных с участием разных видов лиственницы, хотя такое сравнение могло бы только усилить преимущества метода полногеномного секвенирования.

5. Соответствуют ли группы популяций лиственницы, объединенные диссертантом на основании полногеномного генотипирования (уральские, сибирские и алтайские), ранее выделенным в этом регионе другими авторами, например, на основе изоферментных маркеров (публикации Ю.А. Янбаева, З.Х. Шигапова с соавторами) или на основе ДНК-маркеров (публикации С.В. Боронниковой, Ю.С. Нечаевой) и т.д.?

6. Проведенные исследования выявили участки генома, содержащие однонуклеотидные полиморфизмы, изменчивость которых статистически достоверно связана с вариабельностью экологических факторов. Однако, учитывая высокий полиморфизм рода *Larix* Mill., можно ли однозначно судить о причинах, определяющих эту изменчивость? С одной стороны, они могут отражать адаптационный потенциал именно лиственницы сибирской, а с другой – в условиях широкого ареала в процессе эволюции в этом роде могли обособиться географические расы, экотипы или даже самостоятельные виды. Какие критерии использовали для оценки вида при взятии образцов? Удалось ли обнаружить генетические маркеры и выделить среди них те, изменчивость которых а) находится под влиянием отбора; б) связана с переменными окружающей среды?

7. Среди биоклиматических переменных диссертант выделила 9 важных параметров, но, на мой взгляд, среди них упущен еще один – температура почвы, которая безусловно, существенно влияет, например, на ширину годовичных колец у деревьев в популяциях, произрастающих в условиях криолитозоны (вечной мерзлоты).

8. В работе имеются расхождения по количественным показателям, например, для работы было собрано 492 образца, а набор маркеров получен для 488. Возможно, у четырех деревьев ДНК при выделении оказалась деградированной. Однако при описании дендрофенотипических данных заявлено 27 признаков, а в таблице 2 представлено лишь 10. Почему?

9. Качество оформления диссертационной работы оставляет хорошее впечатление, но в работе имеются неисправленные опечатки. Например, стр. 19 (2-й абзац, 5-я строчка снизу: «закономерносте**и**»), стр. 37 (1-я строчка сверху: «расст**и**чных»), стр. 42 (в названии

подраздела: «под влияни~~я~~м») и некоторые другие.

10. В диссертационной работе приводится большое количество сокращений как общепринятых, так и частных (понятных только узкому кругу исполнителей), которые при их обилии, трудно воспринимаются при чтении и требуют постоянного к ним обращения, что отражается на смысловом восприятии основного текста. Для удобства пользования их следовало вынести на отдельный лист.

Вместе с тем, отмеченные недостатки и пожелания легко устранимы и ни в коем случае не снижают высокий уровень теоретических и практических результатов, представленных С.В. Новиковой в диссертационной работе.

Диссертационная работа на тему «**Изучение генетической адаптации в популяциях лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) с использованием данных полногеномного генотипирования**» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с пп.9-14 Положения № 842 «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. (с действующими изменениями), а ее автор **Серафима Валерьевна Новикова** заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Я, Ветчинникова Лидия Васильевна, согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации С.В. Новиковой, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки России и ВАК при Минобрнауки России, в том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ИОГен РАН, на сайте ВАК при Минобрнауки России, в единой информационной системе.

Официальный оппонент:

Ветчинникова Лидия Васильевна

доктор биологических наук (специальность 1.5.21 - физиология и биохимия растений),
доцент (РАН), главный научный сотрудник лаборатории лесных биотехнологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института леса -
обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской
академии наук» (ИЛ КарНЦ РАН)

Адрес: 185910 Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11. ИЛ КарНЦ РАН
тел./факс (8142)76-81-60, 76-95-00,

сайт: <http://forestry.krc.karelia.ru/> e-mail: forest@krc.karelia.ru

29 октября 2025 г.

