

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Горобейко Ульяны Васильевны «Морфологическая и генетическая изменчивость Восточной ночницы *Myotis petax* Hollister, 1912 на юге Дальнего Востока России», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12. – зоология

Еще недавно рукокрылые (Chiroptera), несмотря на видовое многообразие, были едва ли не наименее изученным отрядом млекопитающих. В значительной степени это проявлялось в неустоявшейся систематике, спорных вопросах идентификации отдельных видов, в появлении разрозненных работ по цитогенетике или молекулярной филогении рукокрылых. Использование для идентификации исключительно морфологических признаков затрудняло разделение видов и подвидов, слабо различающихся по этим признакам. За последние пару десятилетий интерес к изучению этой группы существенно возрос, что, несомненно, связано и с тем, что рукокрылые могут выступать в роли переносчиков многих заболеваний, опасных и для человека. Значительно расширились наши знания о границах ареалов обитания отдельных видов, о филогенетических отношениях между видами. Была отмечена важность применения молекулярно-генетических подходов для решения спорных вопросов таксономии рукокрылых и анализа их кариотипов. При этом, изучение внутривидовой структуры широкоареальных видов, к которым относится Восточная ночница *Myotis petax*, оставалось одной из нерешенных задач, что, несомненно, подчеркивает актуальность избранной темы исследования.

Диссертация построена по стандартному принципу и содержит все необходимые разделы: введение, главы «Литературный обзор», «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключение, выводы, список литературы, список сокращений, приложения. Работа изложена на 136 страницах, в основном тексте содержит 17 рисунков и 27 таблиц, хотя автор приводит другие цифры в описании структуры работы. Список литературы содержит 151 источник, из них 112 на иностранных языках. Название полностью отражает содержание работы.

«Введение» содержит все необходимые подразделы. Автор со ссылкой на современную научную литературу и источники прошлых лет обосновывает актуальность избранной темы, научную новизну и значимость исследования, показывает степень проработанности темы. Цель сформулирована четко. Формулировка первой задачи выглядит не совсем корректной. Наверное, автор подразумевал использование методов дифференциального окрашивания хромосом, а не «методов дифференциально-окрашенных хромосом». Также следует отметить, что первое положение, выносимое на защиту,

выглядит очень общим и применимо не только к рукокрылым, но и к любым другим таксонам.

Глава «Литературный обзор» написана достаточно хорошим языком и показывает интерес автора к выбранной теме исследования. В значительной мере акцент в главе смещен на историю исследования рукокрылых и основного объекта исследования, при этом вопросам применения молекулярно-генетических методов, важности их для масштабных исследований уделено совсем немного внимания. Крайне досадно, что автор, описывая кариологические исследования рукокрылых, даже не упоминает о наличии у некоторых видов нестандартных систем половых хромосом, а метод флуоресцентной гибридизации *in situ* упоминает только в свете филогенетических исследований (стр. 16 «Для филогенетического анализа рукокрылых также применяется метод межвидовой перекрестной флуоресцентной гибридизации (FISH)»). При этом автор не ссылается на многие значимые работы в области молекулярной цитогенетики рукокрылых, например, Vollet, Eick, 2012 (Chromosome evolution in bats as revealed by FISH: the ongoing search for the ancestral chiropteran karyotype) и Sotero-Caio, Baker, Volleth, 2017 (Chromosomal Evolution in Chiroptera). Ниже суммированы основные замечания по главе «Литературный обзор»:

Стр. 15 «В эволюции кариотипа рукокрылых, и в частности, семейства Vespertilionidae, где значительную роль играют робертсоновские перестройки (центрические слияния и разделения), что проявляется в постоянстве числа хромосомных плеч, при различном диплоидном числе». Следует уточнить, что все же некоторые группы летучих мышей характеризуются крайне высокой степенью перестроенности кариотипов (см. данные по цитогенетике летучих мышей родов *Tonatia* (Phyllostominae) и *Micronycteris* (Micronycterinae), а также *Lasionycteris noctivagans*; в семействе Vespertilionidae – роды *Neoromicia*, *Rhogeessa* и *Kerivoula*).

Стр. 15 «Данные признаки видоспецифичны и выявляются последовательным применением методов...». Непонятно, почему именно последовательным?

Стр. 16 «Для филогенетического анализа рукокрылых также применяется метод межвидовой перекрестной флуоресцентной гибридизации (FISH) целых хромосом *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797) или *Aselliscus stoliczkanus* (Dobson, 1871) на хромосомы исследуемого вида (Mao et al., 2010; Kulemzina et al., 2011; Volleth, 2013), что позволяет идентифицировать целые хромосомные плечи в кариотипе другого вида». В данном предложении наблюдается некорректное использование терминологии, поскольку гибридизуют не целые хромосомы, а ДНК библиотеки отдельных

хромосом. Кроме того, FISH позволяет выявлять не только целые хромосомные плечи, но и их участки, а также некоторые внутривидовые перестройки. Также список используемых наборов пэинтинг проб для изучения кариотипов рукокрылых давно не ограничивается ДНК библиотеками двух вышеупомянутых видов.

Стр. 26 «Хотя кариотипы других дальневосточных видов ночниц достаточно хорошо исследованы с Японских островов, хромосомные данные *M. petax* из Японии не известны». Возникает вопрос, если кариотипы исследованы, то почему неизвестны хромосомные данные?

Заключительное предложение Литературного обзора (стр. 26 «Всё это обеспечило выбор нами восточной ночницы, как объекта исследования с одной стороны, и с другой - слабая внутривидовая изученность вида на территории Дальнего Востока России») построено стилистически неверно, а пропуск глагола затрудняет восприятие написанного.

Структура изложения материала не всегда нелогична. Так, в главе «**Материалы и методы**» приводится общая информация о ядрышкообразующих районах и методах их детекции, о гетерохроматине и его составе, о структуре контрольного региона митохондриальной ДНК. Эти части достаточно обширны и кажется более логичным привести эту информацию в Литературном обзоре.

Автор выбрал сложную систему кодировки образцов: номера присвоены отдельным животным, коды присвоены местам сбора образцов, дополнительно введены номера образцов из GenBank, используется выделение собственных образцов жирным шрифтом и т.п.. Все это в совокупности очень сильно осложняет восприятие материала, тем более что в описании таблиц не указано, чему именно присвоены номера или коды. Так, в Таблице 1 первая колонка обозначена просто символом «№». По-видимому, это «коллекционный номер», как показано в Таблице 2, где в одной из колонок приводятся эти же номера. В Таблице 3 отсутствуют коды для некоторых точек. Почему?

Кажется очевидным, что при подсчете числа плеч аутосом в кариотипе не учитывается морфология половых хромосом. В свет этого непонятно уточнение на стр. 40: «Обычно подсчитывают число плеч аутосом (основное число) - NFa. В данном случае морфология половых хромосом не учитывается, так как X- и Y- хромосомы могут иметь различную морфологию». Что подразумевает автор, указывая, что «X- и Y-хромосомы могут иметь различную морфологию»?

В этой же главе встречается понятие «примитивный кариотип» (стр. 41. «Примитивным кариотипом семейства Vespertilionidae принят т.н. *Myotis-type* кариотип с  $2n = 44$  и числом плеч аутосом (NFa) равным 50 (Baker, 1970)») при этом отсутствует определение этого термина.

Некорректным видится приведение параметров центрифугирования в об/мин (не g), а также указание объемов взятых реактивов без приведения концентраций стоковых растворов или конечных концентраций веществ в растворах и смесях. Например, на стр. 46 указано, что «амплификацию проводили... в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 3-4 мкл тотальной ДНК, 2,5 мкл 10× буфера (Sibenzim, Россия), 2,5 мкл 20 mM смеси dNTP, 2 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы (Sibenzim, Россия) и деионизированную воду». Какова концентрация ДНК? Какой концентрации стоковый раствор праймера? Сколько единиц активности полимеразы взято на реакцию? Сходная ситуация наблюдается в других частях раздела.

Вопросы вызывает и выбранная схема синтеза фрагментов митохондриальной ДНК (см. стр. 46 «... 7 мин достраивание цепей при 72°C...»). Для чего задано столь длительное время финальной элонгации, если максимальная длина ПЦР-продукта 900 п.н.?

В главе «**Результаты и обсуждение**» приводится последовательное изложение полученных в работе данных. Несколько необоснованной видится разбивка данных по ДНК-баркодингу и анализу участка контрольного региона митохондриальной ДНК на отдельные разделы, перемежающиеся цитогенетическими данными и анализом карниометрических параметров.

На рисунке 5 (стр. 55) представлены GTG-окрашенные хромосомы *M. petax*. Несмотря на невысокое качество G-бэндинга, вызванное, по-видимому, особенностью выполнения окрашивания после отмытки от серебра, не вызывает сомнения, что пара хромосом 7 на представленном рисунке не имеет коротких плеч. При этом на стр. 56 текста диссертационной работы написано: «Мы также не обнаружили присутствия коротких гетерохроматиновых плеч на 24 или 25 паре аутосом восточной ночницы в своих исследованиях, однако короткие эухроматиновые плечи присутствовали на седьмой паре аутосом». Поскольку нет коротких плеч у пар хромосом 7 и на рисунках 6 и 7, то возникает вопрос, по какому критерию автор определял наличие или отсутствие коротких плеч хромосом? Так же отмечу, что сам автор относит пару хромосом 7 к ряду акроцентрических-субтелоцентрических хромосом, а в главе «Материалы и методы» на стр. 40 пишет, что «Акроцентрические и субтелоцентрические хромосомы условно считаются одноплечими, остальные - двухплечими». В совокупности эти несоответствия заставляют усомниться в корректности цитогенетического анализа данных.

На рисунке 7Б (стр. 60) X-хромосомы существенно отличаются по размеру (в автореферате это рисунок 1С на стр. 12). Чем это вызвано? Само название рисунка 7 («Распределение гетерохроматина в кариотипе *M. petax*») очень неудачно и вызывает ряд вопросов к автору. Какой тип гетерохроматина выявляется при СВГ-окрашивании? Что

представляют собой темноокрашенные и неокрашенные участки хромосом на рисунке? При этом в автореферате на рисунке с таким же названием приведен GTG-окрашенный кариотип одной из особей (рисунок 1D на стр. 12).

Из рисунка 12 на стр. 84, на котором приводится пример электрофореза исследуемого участка контрольного региона, неясно, какой маркер использовался для определения длин последовательностей? Какова длина фрагментов? Что нанесено на дорожку перед маркером? Очевидно, что номера дорожек соответствуют номерам животных из таблицы 1, но лучше бы было добавить эту информацию в описание.

Стр. 85 «Поскольку контрольный регион не является белок-кодирующим геном, допустимо анализировать отдельные части нуклеотидной последовательности: удаление части последовательности не повлияет на конечный белковый продукт». О каком белковом продукте идет речь в случае белок-некодирующего гена?

Автору следовало в тексте четко прописать принципы присвоения кодов, так как наблюдается неоднозначное трактование кодов мест отлова по тексту. Так, например, код КИТ (без номера), присвоенный в разделе «Материалы и методы» образцам из Китая (см. стр. 42), в главе «Результаты и обсуждения» используется как для образцов из Китая (стр. 69-70), так и для образцов из Китая и Маньчжурии (стр. 65), при этом на стр. 70 для образцов из Маньчжурии введен отдельный код – MAN. По-видимому, данная ситуация возникла из-за необходимости объединения локальных и региональных выборок для различных этапов анализа, но она существенно затрудняет восприятие написанного.

**«Заключение»** представляет собой краткую аннотацию результатов диссертационной работы.

**«Выводы»**, за исключением первого (см. замечание про подсчет числа плеч аутосом), полностью обоснованы и полностью соответствуют целям и задачам работы.

**Автореферат** соответствует тексту диссертации.

Несмотря на замечания, работа в целом производит хорошее впечатление. Отдельно стоит отметить, что автор принимал непосредственное участие во всех этапах работы от сбора материала до анализа полученных данных, что характеризует его, как разностороннего исследователя, способного выполнять самый различный спектр работ. Встречающиеся в тексте опечатки, пунктуационные, грамматические и стилистические ошибки не снижают в итоге качество работы. Комплексный подход, использованный автором, расширяет наши представления о морфологической и генетической изменчивости у Восточной Ночницы на Дальнем Востоке России и, полагаю, может лечь в основу дальнейших исследований внутривидовой структуры этого и других широкоареальных видов.

Таким образом, диссертация Горобейко Ульяны Васильевны является научно-квалификационной работой, по актуальности, новизне, методическому уровню, научной и практической значимости результатов соответствующей требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

**Романенко Светлана Анатольевна,**

доктор биологических наук по специальности 03.01.07. - Молекулярная генетика,

старший научный сотрудник Лаборатории цитогенетики животных

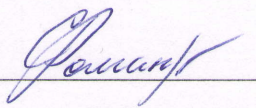
ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН

630090, г. Новосибирск,

Пр-т Ак. Лаврентьева, 8/2,

Тел.: +7 (383) 363-90-63

[rosa@mcb.nsc.ru](mailto:rosa@mcb.nsc.ru)

  
(подпись)

Дата «10» января 2022 г.

