

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Тишаковой Екатерины Валерьевны
"ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОЛОВЫХ ХРОМОСОМ
ИГУАНООБРАЗНЫХ И ГЕККОНООБРАЗНЫХ",

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы исследования. Генетические основы детерминации пола – одна из фундаментальных проблем современной биологии. Актуальность и новизна исследования не вызывает сомнений – в генетике детерминации пола остается много нерешенных вопросов даже для сравнительно хорошо изученных млекопитающих, не говоря уже о сложной группе рептилий, для которых известны различные типы детерминации пола, включая генетический (гетероморфные половые хромосомы ♀XX/♂XY, ♂ZZ/♀ZW, множественные половые хромосомы) и зависящий от параметров окружающей среды. В последнем случае не поддаются выявлению специализированные половые хромосомы, но ряд эпигенетических и генетических факторов оказывается вовлечен в процесс дифференцировки гонад. В этой связи анализ генетического состава половых хромосом представителей разных таксонов чешуйчатых оказывается крайне востребованным для понимания эволюции как самих хромосом, в первую очередь перехода от гомоморфных к гетероморфным половым хромосомам, так и эволюции генетических факторов детерминации пола. Особенно интересна группа Gekkota, в которой описаны практически все возможные у позвоночных типы детерминации пола, иногда кардинально различающиеся у близких видов. Использованный в данной работе методический подход, с применением современных цитогенетических методов и биоинформатического анализа, и направленный на выявление синтенных групп в составе половых хромосом, представляется адекватным для решения поставленных задач исследования.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. Автором впервые проанализированы синтенные группы, характерные для половых хромосом четырех видов чешуйчатых, представляющих разные филетические линии (игуанообразных и гекконообразных): заборной малахитовой игуаны *Sceloporus malachiticus*, йеменского хамелеона *Chamaeleo calyptratus*, юкатанского полосатого геккона *Coleonyx elegans* и центральноамериканского геккона *Coleonyx mitratus*. Анализ состава и распределения синтенных групп позволил выявить наиболее вероятные пути формирования половых

хромосом изученных видов, показать, что в эволюционной истории игуанообразных и гекконообразных могли иметь место эпизоды конвергенции и параллелизмы.

Впервые описан кариотип центральноамериканского геккона *Coleonyx mitratus*, который оказался сходен с ранее описанным хромосомным набором близкородственного вида *C. elegans*, оба вида имеют множественные половые хромосомы $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$, близкие по генетическому составу, что показано как для X, так и для Y хромосом.

Сравнительный анализ генетической структуры хромосом позволил проследить эволюцию изменения состава половых хромосом и некоторых аутосом в разных группах высших позвоночных, включая птиц и однопроходных млекопитающих, что подтверждает представления о множественности событий при формировании половых хромосом в эволюции Amniota. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы для анализа особенностей хромосомных наборов и сборки геномов других видов рептилий и дальнейшего изучения эволюции половых хромосом у высших позвоночных.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности и оформления. Диссертационная работа изложена на 123 страницах, имеет классическую структуру: Введение, Обзор литературы (6 разделов и заключение), Материалы и методы исследования, Результаты (3 раздела, каждый с тремя подразделами), Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы (190 источников, все на английском языке), 13 рисунков в основном тексте и 3 рисунка в Приложении 3, 11 таблиц (из них 6 в основном тексте, 5 – в Приложениях 1 и 2), а также Приложения 1-3.

Во Введении автор обосновывает актуальность выбранной темы и формулирует цель и задачи исследования, выделяет научную новизну, теоретическое и практическое значение, перечисляет положения, выносимые на защиту. Цель исследования, задачи, а также положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно. Достаточно подробно описан **личный вклад автора**, который, несомненно, является высоким, включает весь процесс получения данных, от клеточных культур, приготовления суспензий и цитологических препаратов метафазных хромосом, подготовки зондов хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, сатДНК и их локализацию с помощью FISH, включая микроскопический анализ, а также биоинформатический анализ данных от первичныхборок до анализа в тематических программах (RepeatExplorer2, Tandem REpeat ANalyzer и др.). Следует отметить особую сложность получения данных по генетическому составу половых хромосом, распределению сателлитной ДНК, а также анализа полученных данных. Перечисленные компетенции позволяют оценить квалификацию автора как высокую и дают основание считать, что К.В. Тишакова является сложившимся исследователем, способным к самостоятельной научной работе.

В Главе 1. "Обзор литературы" представлена характеристика проблемы и объектов исследования, а также методических подходов для изучения структуры половых хромосом. В Обзоре литературы сжато описано современное состояние изучения механизмов детерминации пола у позвоночных. Очевидно, что полноценно раскрыть эту сложную тему в кратком обзоре невозможно, но диссертанту удалось провести анализ основных работ с прицелом на собственные исследования, что свидетельствует о хорошем знании научной литературы и умении анализировать информацию. Отдельно следует выделить раздел "1.5. Методы идентификации и исследования половых хромосом", в котором критически проанализированы современные методы изучения генетической структуры хромосом, в том числе половых, что необходимо для выбора методик для собственных исследований. Обзор литературы логично завершается описанием современных данных для выбранных объектов исследования и предоставляет хорошо аргументированное обоснование для выбора видов, изученных в рамках данного диссертационного исследования.

Представленный обзор позволяет оценить современное состояние исследований в данной области биологии и сделать заключение об актуальности темы диссертационного исследования.

В Главе 2. "Материал и методы" достаточно подробное описание методик включает все этапы работы, ее молекулярную часть (описание праймеров, использованных для амплификации и мечения последовательностей ДНК с помощью ПЦР, выделение ДНК, получение специфичных хромосомных ДНК-библиотек, ПЦР-картирование Y-специфичных RAD-seq маркеров, получение зондов для FISH на основе хромосомоспецифичных ДНК-библиотек, а также зондов, содержащих сатДНК, гены рибосомной РНК и теломерные повторы, секвенирование), цитогенетическую (культуры и получение суспензий хромосом, FISH), биоинформатическую, включая анализ и депонирование данных в международные базы данных.

Глава 3. "Результаты" включает три раздела, в каждом из которых описаны данные по половым хромосомам изученных групп (заборной малахитовой игуаны *Sceloporus malachiticus*, йеменского хамелеона *Chamaeleo calyptratus*, юкатанского полосатого геккона *Coleonyx elegans* в сравнении с *Coleonyx mitratus*).

В каждом разделе подразделы содержат информацию первичных данных по секвенированию ДНК-библиотек и идентификации последовательностей сатДНК, специфичных для половых хромосом, а также визуализация их локализации. В итоге были получены и отсекуированы специфичные ДНК-библиотеки половых хромосом для заборной малахитовой игуаны, йеменского хамелеона, юкатанского полосатого геккона. При использовании биоинформатического анализа определены районы гомологии и

синтенные группы для половы хромосом этих видов и референсных (*Anolis carolinensis*, и др.). Отдельной сложной, но успешно решенной задачей было изучение сателлитной ДНК в гетерохроматиновых районах половых хромосом. Несколько скупое описание результатов компенсируется прекрасными иллюстрациями и достаточно информативными подписями к рисункам.

Глава 4. "Обсуждение" также разбита на три подраздела, которые соответствуют таковым главы 3. "Результаты". Для каждого из объектов кратко обсуждены полученные результаты и убедительно показана новизна исследования. Так, для заборной малахитовой игуаны *S. malachiticus*, как и ряда других видов игуан клады Pleurodonta, показано наличие нео-половых хромосом, в данном случае выявлены слияния синтенной группы, соответствующей предковой половой хромосоме X (ACAX) с четырьмя парами хромосом (ACA11, ACA16, ACA17, ACA18). Для всех изученных видов чешуйчатых через анализ гомологии с хромосомами (соответствующими зондами) анолисов показана гомология с различными аутосомами курицы. Такой подход с использованием зондов весьма перспективен, в данном случае он дает возможность проследить эволюцию как половых хромосом (множественных в случае гекконов или однопроходных млекопитающих, утконоса и ехидны), так и разных филетических линий Amniota.

Анализ структуры гетерохроматина в последние годы привлекает большое внимание, в том числе и в том аспекте, что рассмотрен в данной диссертационной работе. Интересно, что накопление сателлитных последовательностей, имеющих разное происхождение и состав в филетических линиях, может рассматриваться как сопутствующее дивергенции явление, тем более что часть таких последовательностей предположительно формируют прсевдоаутосомный регион (PAR), но, вероятно, возможен и другой эволюционный сценарий, при котором именно перестройка половых хромосом оказывается иницилирующим дивергенцию событием. Полученные в данной работе данные, несомненно, будут востребованы научным сообществом для дальнейшей разработки представлений об эволюции половых хромосом.

Изложение результатов и их обсуждение соответствует поставленным задачам.

Обоснованность научных положений, достоверность выводов и заключений диссертационной работы. Диссертационная работа выполнена на высоком профессиональном уровне, результаты получены с применением современных молекулярно-генетических методик, использована высококачественная аппаратная база, данные проанализированы с использованием адекватно подобранных биоинформатических методов. Результаты опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных

журналах. Все это позволяет считать полученные результаты достоверными, а выводы - обоснованными.

Следует подчеркнуть, что комплексность данной работы проявляется не только в использовании методов из разных областей биологии, но и в идейном подходе к рассмотрению проблемы эволюции хромосомных наборов. Обладая определенной морфологией, как правило, видоспецифичной, хромосомы имеют сложную молекулярно-генетическую структуру, которая определяет их функцию и является результатом эволюции. Именно попытка разобраться в преемственности состава, формы и функции хромосом чешуйчатых особенно интересна в данной работе, так как она объясняет не только специфику множественных половых хромосом у изученных представителей рода *Coleonux*, но и разнокачественность состава сателлитных ДНК половых хромосом разных филетических линий.

Положения, выносимые на защиту, поддержаны полученными результатами. Выводы соответствуют поставленным цели и задачам. Новизна, актуальность и научная значимость представленного исследования не вызывают сомнений.

Автореферат соответствует тексту диссертационной работы и достаточно полно отражает ее основное содержание. Личный вклад К.В. Тишаковой описан в соответствующем разделе диссертации, он может быть оценен как основной на всех этапах работы: получение результатов, их цитогенетический и биоинформатический анализ и публикация статей.

Структура диссертационной работы логична, текст написан хорошим языком. В тексте диссертации практически отсутствуют опечатки, лишь в 6 выводе замечена опечатка в слове сателлитной (пропущена одна «л»), ошибка на с. 63: "ко-локализовалася", в тексте автореферата неправильное окончание (с. 3, «190 ссылки»). Текст, как и иллюстрации, тщательно подготовлен, выверен, что также характеризует Катерину Валерьевну Тишакову как ответственного, внимательного и кропотливого исследователя.

Следует подчеркнуть, что замечания носят технический характер и ни в коей мере не снижают общего высокого уровня представленной работы.

По теме диссертационного исследования опубликованы три статьи в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах из перечня ВАК. Результаты работы докладывались на различных профильных научных конференциях.

Материалы диссертации могут быть использованы в таких ведущих исследовательских институтах, как МГУ им. М.В. Ломоносова, ИМКБ СО РАН, ИПЭЭ РАН, ИБР РАН, ИЦиГ СО РАН, ЗИН РАН и других, где ведутся исследования по генетике,

зоологии и эволюции, а также в лекционных и практических курсах по генетике в высших учебных заведениях.

Заключение. Диссертационная работа Тишаковой Екатерины Валерьевны "Генетический состав половых хромосом игуанообразных и гекконообразных", выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Трифонова Владимира Александровича, является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных методов исследования. Результаты, полученные в работе, имеют высокую значимость для решения проблем современной генетики и эволюционной биологии. Диссертационная работа по содержанию, актуальности, новизне, методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённых постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, соответствует заявленной специальности 1.5.7. Генетика, а её автор, Тишакова Екатерина Валерьевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории
эволюции генома и механизмов видообразования
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН

Ирина Юрьевна Баклушинская

26 февраля 2025 г.

Контактные данные:

119334 Москва ул. Вавилова, 26 ИБР РАН
+7 916 1656370
i.bakloushinskaya@idbras.ru
Ирина Юрьевна Баклушинская

подпись И.Ю. Баклушинской заверяю
ученый секретарь ИБР РАН,
кандидат биологических наук, доцент



Марина Юрьевна Хабарова