

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

ведущего научного сотрудника, доктора биологических наук
Агафонова Александра Викторовича
на диссертационную работу Богдановой Веры Сергеевны
“Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха
(*Pisum sativum* L.)”,
выполненную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность тематики, связанной с вопросами ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха обусловлена тем, что культурный горох имеет большое разнообразие диких сородичей, представляющих богатый потенциал в качестве доноров хозяйственно-ценных признаков. Основной путь введения полезных признаков в сорта лежит через половую гибридизацию. И здесь вступают в силу все законы генетических и физиологических взаимодействий между геномами родительских форм, как на пре-зиготическом, так и пост-зиготическом уровнях. В работе в разных аспектах показаны особенности репродуктивных барьеров, характерных для сколько-нибудь отдаленных скрещиваний между культурными и дикими формами гороха.

Диссертация имеет выверенную традиционную композицию и изложена на 198 страницах машинописного текста форматом 14 пт., из которых 16 страниц составляет обширная таблица **Приложения**. Работа включает разделы: **Введение** (13 стр.), **Обзор литературы** (29 стр.), **Материалы и методы** (18 стр.), Глав 3–5, в которых описаны собственно результаты, с общим объемом 90 стр., **Заключение** (5 стр.), **Выводы** (7 пунктов), **Список литературы** 136 источников, из которых 15 русскоязычных.

Актуальность проблемы изложена кратко и четко, легко воспринимается при первом чтении. Поставленная **цель и задачи** исследования описаны с учетом ранее высказанных рекомендаций на стадии предварительного рецензирования. Сформулировано 7 конкретных задач, обеспечивающих достижение цели работы, как всестороннего изучения генетических основ ядерно-цитоплазматического конфликта, наблюдаемого при скрещивании культурного подвида гороха *P. sativum* subsp. *sativum* с дикими сородичами подвида *Pisum sativum* subsp. *elatius*.

Научная новизна работы описана кратко и ясно на одной странице. **Теоретическая и практическая значимость работы** приведены в тексте более развернуто, что на наш взгляд вполне оправдано.

Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы в 4-х пунктах.

Несколько тавтологическим представляется положение 1, дословно «**Ядерно-цитоплазматический конфликт при скрещивании дикорастущей и культурной форм гороха возникает за счет несовместимости ядерного и пластидного генома**». В такой редакции это положение можно было объединить с положением 2.

Подраздел **Личный вклад автора** сформулирован четко и убедительно.

Глава 1. Обзор литературы составлен из пяти подглав, логично дифференцированных на подразделы и написанных ясным лаконичным стилем. Вызвали возражения только некоторые выражения, связанные с особенностями перевода терминов с английского языка. Так, получает другой смысл сочетание «несовместимость гибридов», хотя речь, по видимому, идет о «гибридной несовместимости», как обозначено ниже (стр.20–21). Вероятно, более уместно было бы вместо «окаймляющие микросателлитные маркеры» применить термин «фланкирующие» (стр. 36). В целом, прочтение **литературного обзора** свидетельствует о том, что соискатель глубоко владеет проблемой ядерно-цитоплазматической несовместимости, выходящей далеко за пределы изучаемого объекта. В данном контексте уместно выглядит подраздел **1.5. Заключительные замечания**, в котором резюмируется биологический смысл возникновения ядерно-цитоплазматического конфликта.

Глава 2. Материалы и методы включает **15 (!)** подразделов, в каждом из которых прописан конкретный методический прием или процедура. Глава написана строгим научным языком, практически без грамматических ошибок и опечаток. Впечатляет общее число молекулярных маркеров (**19**), использованных в работе для генетического анализа. **Из подглавы 2.4.** для меня осталось неясным, все ли использованные линии гороха, включая множество образцов из зарубежных коллекций, прошли 7-8 поколений самоопыления, или только тестерные и лабораторные линии. Безусловно, производит сильное впечатление состав и общий объем растениеводческой и биохимической кухни, а также компьютерной обработки полученных результатов.

Глава 3 разделена на 4 подглавы и посвящена цитологическим аспектам проявлений ядерно-цитоплазматической несовместимости у гибридов в разных комбинациях скрещиваний. В основу изучения была положена линия ВИР320, которая была отнесена к дикому подвиду *P. sativum* subsp. *elatius*. В главе всесторонне проработаны фенотипические особенности морфологического маркера хлорофильной окраски у гибридных растений, которые подтверждены цитологическими данными и

молекулярным методом идентификации кодирующей части пластидного гена *rbcL*, митохондриального маркера *cox1* и маркера *trnK* у индивидуальных растений после гибридизации. Результаты показали, что для нормальной фотосинтетической функции гибридных растений в комбинациях скрещивания ВИР320 x Спринт-1 и ВИР320 x WL1238 необходимо присутствие отцовских пластид. Кроме того, установлено, что фертильность пыльцы гибридов Спринт-1 x ВИР320 существенно не отличается от родительской линии ВИР320, тогда как в реципрокной комбинации ВИР320 x Спринт-1 фертильность пыльцы значительно снижена. Показано, что у этих гибридов с признаками ядерно-цитоплазматического конфликта частота нарушений мейоза значительно выше. В то же время нарушений в процессе митотических делений у гибрида Спринт-1 x ВИР320 и в клетках, взятых с зеленых побегов ВИР320 x Спринт-1, не обнаружено.

Таким образом, в гибридах линии ВИР320, где этот дикорастущий подвид гороха выступает в качестве материнской формы, наблюдается конфликт ядерного и пластидного геномов, что выражается не только в нарушении хлорофильной окраски, но также в нарушении течения мейоза в материнских клетках пыльцы.

В целом, глава написана достаточно профессионально, грамматически правильным стилем с редкими ошибками класса описок.

Глава 4. Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха подразделена на 11 подглав, в каждой из которых прорабатывается конкретный аспект несовместимости у гибридов с участием линии ВИР320.

В подглаве 4.1. Определение минимального числа ядерных генов, вовлеченных в конфликт ядра и пластид выявлено множество детальных подробностей, связанных с ядерно-цитоплазматической несовместимостью в популяциях рекомбинантных инбредных линий (РИЛ).

В подглавах 4.2 и 4.3. были подробно изучены закономерности наследования и фенотипического проявления генов *Scs1* и *Scs2*, которые были идентифицированы в ходе генетического анализа ядерно-цитоплазматической несовместимости. Сделано заключение, что каждый из локусов, *Scs1* и *Scs2*, будучи в гетерозиготе, несколько снижает фертильность пыльцы, а совместное действие двух локусов приводит к значительному снижению фертильности пыльцы, а также хлорофильной недостаточности и редукции вегетативных органов.

В подглавах 4.5. – 4.8. показано влияние аллельного состояния генов *Scs1* и *Scs2* на жизнеспособность мужских гаметофитов и спорофитов. С помощью уникальной

серии скрещиваний был сделан вывод, что аллель *Scs1* культурного гороха является леталью для мужских гаметофитов и спорофитов на фоне цитоплазмы дикого гороха *P. elatius* линии ВИР320, а гомозиготы по аллелю *Scs2_1238* на таком фоне цитоплазмы жизнеспособны.

В подглавах 4.9. и 4.10. подробно приведены процедуры по картированию локусов *Scs1* и *Scs2*. В экспериментах выявлен ряд феноменов, трудно поддающихся однозначной интерпретации. Даны оригинальные варианты подходов для их объяснения.

В подглаве 4.11. показано возможное существование других генов, влияющих на жизнеспособность гибридных растений и участвующих в формировании ядерно-цитоплазматической несовместимости. Данные по расщеплению генотипических классов в скрещиваниях ВИР320 свидетельствуют о возможном влиянии других генов, число которых составляет 2–3, а аллельное состояние этих генов варьирует от линии к линии.

Глава 5, озаглавленная Гены-кандидаты на роль участников ядерно-цитоплазматического конфликта у гороха, подразделена на **9 подглав**, в них последовательно разбираются варианты некоторых пластидных генов – потенциальных участников ядерно-цитоплазматического конфликта.

Обоснование целесообразности определения нуклеотидных последовательностей пластидных геномов линии культурного гороха WL1238 и четырех диких линий приводится в **подглаве 5.1.** Высокопроизводительное секвенирование пластов проводилось на платформе IonTorrent.

Пути поиска генов – участников ядерно-цитоплазматического конфликта обозначены в **подглаве 5.2.** Были приняты за основу предположения, что (1) белок-кодирующие локусы являются более вероятными кандидатами и (2) наиболее вероятной причиной ядерно-цитоплазматической несовместимости является изменение первичной структуры белка.

Кроме того, в **подглаве 5.3.** предлагаются пути поиска ядерных генов, функционально связанных с пластидными генами-кандидатами, поскольку весьма вероятно, что ядерно-цитоплазматический конфликт возникает, если полипептиды, которые кодируются в ядре и пластидах, окажутся плохо подходящими друг к другу. Сделан вывод, что наиболее вероятным кандидатом на роль участника ядерно-цитоплазматического конфликта становится пластидный ген *accD*.

Анализ структуры аллелей гена *accD* приводится в **подглаве 5.4.** Установлены

вариабельные позиции в полипептидах, кодируемых аллелями этого гена и наличие аминокислотных замен в исследованных образцах.

В **подглаве 5.5.** показывается совпадение аллельного состояния ядерного гена *Vscp3*, вовлеченного в анализ на основании гомологии с геномом однолетней люцерны *Medicago truncatula*, с аллельным состоянием *Scs1* у гороха, что подтверждает предположение об идентичности локусов *Vscp3* и *Scs1*.

Осталось неясным одно, почему в **подглаве 5.6.** определение аллелей гена, идентифицированного у гороха, как *Scs1*, обозначено, как структура аллелей гена *Vscp3*, названного так у *Medicago truncatula*.

Потенциальные взаимодействия генов-кандидатов, участвующих в конфликте, анализируются в **подглаве 5.7.** Здесь снова подтверждается предположение, что локус *Vscp3* совпадает с ранее описанным *Scs1*, ответственным за проявления ядерно-цитоплазматической несовместимости. Тогда снова возникает вопрос о правомерности использования названия *Vscp3* применительно к гороху.

В **подглаве 5.8.** разбирается вопрос совместимости представителей рода Горох в свете данных о строении субъединиц **ацетил-коА карбоксилазы**. Структура этого фермента, возможно, является еще одним фактором, определяющим несовместимость пластидного генома с ядерным. Обрисованная схема взаимодействия действительно трудна для понимания, а вывод заключается в том, что, дословно, **«образцы гороха нельзя сгруппировать так, чтобы все они были совместимы внутри группы и несовместимы относительно образцов другой группы (или групп)».**

Наконец, в **подглаве 5.9.** разбираются другие ядерные локусы, потенциальные участники конфликта. Эта подглава выглядит наиболее трудной для восприятия. Снова появляется сочетание «окаймляющими маркерами» (стр 155). Итоговый абзац подглавы несколько туманно обрисовывает локальный результат.

Заключение суммирует результаты работы и написано более простым и ясным стилем, чем некоторые подглавы. Подведен итог, что в результате проведенных исследований впервые в мировой практике предлагается модель несовместимости ядра и пластид, включающую как пластидные, так и ядерные гены-кандидаты.

В конце работы четко сформулировано **7 выводов**, практически полностью соответствующих 7 поставленным задачам.

Диссертация в целом написана грамматически выверенным, но достаточно сложным стилем. Трудность в восприятии работы обусловлена насыщением специальными обозначениями, которые очень непросто отследить в процессе чтения.

Это же замечание касается изложения реферата, который в целом составлен верно и соответствует содержанию диссертации. Отдельные грамматические ошибки, отмеченные в работе, не снижают ее высокой оценки.

Не вызывает сомнений, что диссертационная работа **Богдановой Веры Сергеевны** “Генетический анализ ядерно-цитоплазматической несовместимости у гороха (*Pisum sativum* L.)”, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченным квалификационным исследованием, имеющим реальное теоретическое значение для решения конкретных задач генетики растений, а также для практической селекции гороха.

Работа не только подводит итог исследований на текущий период, но и ставит множество проблемных вопросов, на которые предстоит отвечать в будущем. Она выполнена на высоком методическом уровне и по актуальности, новизне, объему полученного материала и сформулированным выводам соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор **Богданова Вера Сергеевна** заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 — генетика.

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник

Агафонов Александр Викторович

Лаборатория редких и исчезающих видов растений
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Центральный сибирский ботанический сад
Сибирского отделения Российской академии наук
634090 г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, д. 101
Телефон: +7 (383) 339-97-91, 913-456-4839
e-mail: agalex@mail.ru

07.11.2017

