

Отзыв

официального оппонента

на диссертацию **Добровольской Оксаны Борисовны**

на тему « **Молекулярно-генетические основы морфогенеза соцветия пшеницы** »

на соискание ученой степени доктора биологических наук

по специальности 03.02.07 - генетика

Пшеница – это важнейшая сельскохозяйственная культура, которая является основным продуктом питания для большей части населения земного шара. Для использования данной культуры в практических целях необходимо развитие и получение новых фундаментальных знаний, понимание молекулярно-генетических механизмов, определяющих рост и развитие злаков. Изучение генетики соцветия, особенностей его развития лежат в основе продуктивности пшеницы. Поэтому изучение структуры и функции генов, контролирующих развитие столь важного органа растения, каким является соцветие, становится важным и необходимым для решения как фундаментальных проблем генетики развития растения, так и практических задач, обеспечивающих продуктивность пшеницы.

В отличие от арабидопсиса, как модельного объекта, пшеница в силу полиплоидности, размера генома с точки зрения молекулярной генетики изучена недостаточно. Поэтому разработка новой стратегии, современных подходов и методов, являются необходимым условием для изучения к генетики развития соцветия, решения практических задач.

Диссертационная работа Добровольской Оксаны Борисовны посвящена изучению генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы, а именно, развитию колоса – структуре в его составе. В работе автором поставлены четыре крупные задачи, необходимые для расшифровки молекулярно–генетических механизмов развития колоса у злаков. Важной задачей, явно отличающей генетические работы от других, является подбор модели для проведения подобных исследований. Автор поставил задачу сформировать коллекцию линий пшеницы с нарушениями в развитии соцветия с привлечением диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы, выявить гены, контролирующие изучаемые признаки и определить их структуру.

Обширный пласт исследований, проведенных автором, позволил идентифицировать гены и локусы количественных признаков, определить локализацию на картах хромосом и установить их функцию в развитии соцветия. Впервые, в геноме пшеницы автором выявлены ключевые регуляторные гены, контролирующие развитие соцветия, изучена их структурно-функциональная организация у видов пшеницы разной ploidy. Показано, что основные гены WFZP и SHR2 действуют на разных путях развития колоска и принадлежат к разным путям развития растения.

Существенным достижением автора является разработанный комплексный подход для изучения морфогенеза соцветий растений со сложным аллополиплоидным геномом, выполненных на модели, основанной на коллекции мутантов разного происхождения, но имеющих сходные нарушения морфогенеза в развитии соцветия. Идентифицированные гены и выявленные генные сети позволят в дальнейшем определить гены-мишени, с целью возможной их модификации и получению новых перспективных форм, позволяющих увеличить и улучшить урожайность злаков.

Предложенный подход по выявлению генов, основанный на синтении геномов разного происхождения, может быть применен для изучения других видов растений.

К основным существенным результатам диссертанта относятся следующие –

1. Формирование ветвистого колоса, в том числе с дополнительными колосками, связано со сходными нарушениями развития соцветия пшеницы и находится под контролем локусов хромосом 2DS и 2AS;
2. Мутации генов-гомологов WFZP контролируют формирование многоколосковых и ветвистоколосых форм видов пшеницы различной ploидности;
3. Гены WFZP и SHR2, действуя независимо, контролируют идентичность цветковой меристемы на разных стадиях развития колоска пшеницы.

Полученные результаты имеют явное практическое значение. Так разработанные автором молекулярные ДНК маркеры могут быть использованы для картирования генов и локусов количественных признаков злаков у новых перспективных форм, используемых в селекционном процессе. Полученные результаты могут в полной мере быть использованы в педагогическом процессе при чтении курсов «Генетика развития растения», «Биотехнология растения», «Селекция растений». В ходе выполнения диссертационной работы автором использован значительный арсенал методов - электронная микроскопия, генетический анализ и современные методы молекулярной генетики и геномики. Все использованные методы необходимы для решения поставленных в работе задач. Работа выполнена на уникальной коллекции пшеницы с различными нестандартными морфотипами колоса, которые были детально охарактеризованы в работе. Совокупность использованных методов и использование уникальной коллекции пшеницы сделали данную работу важной, оригинальной и ценной с точки зрения фундаментальных исследований и практики.

Диссертация содержит все необходимые традиционные разделы, включает приложение, изложена на 294 страницах печатного текста, содержит 14 таблиц и 69 рисунков. Список цитированной литературы содержит 270 источников.

В главе «Обзор литературы» на 69 страницах изложены современные данные об эволюции злаков, особенностях организации их геномов. Подробно представлены данные о строении цветка и описана морфологическая характеристика соцветия пшеницы, особенности его развития. В данной главе уделено внимание этапам органогенеза высших растений в целом и генетической регуляции морфогенеза соцветия злаков, а также приведены данные о генетической регуляции и поддержания активности меристем у различных видов злаков. Завершает главу заключение, в котором в сравнительном аспекте обобщены результаты по молекулярно-генетическому контролю формирования

соцветия у злаков в сопоставлении с модельным объектом — арабидопсис. Приведены данные по регуляции формирования соцветия в рамках классической системы *WOX-CLAVATA*, сделано заключение об ее универсальности в целом и об особенностях функционирования и формирования меристем у злаков. Подчеркнута важность изучения генетических основ при формировании соцветий у экономически значимых зерновых культур, к которым, в первую очередь, относится пшеница. Тем самым, автором четко обоснована актуальность и практическая значимость поставленных в диссертационной работе задач.

Для решения поставленных задач требовался комплексный подход, основанный на применении широкого спектра современных методов молекулярной биологии, электронной микроскопии и, в первую очередь, методологии генетического анализа. Все используемые методы, а также материалы подробно описаны в Главе 2 — Материалы и методы.

Обращает на себя внимание четкое описание растительного материала, включая происхождение каждой линии и место получения. Приведена таблица с кратким описанием использованных в работе форм.

Главы 3-6 посвящены описанию результатов, каждая из которых имеет самостоятельное заключение. В работе получен богатый экспериментальный материал, который хорошо задокументирован, четко представлен и обсужден. Представленные в работе фотографии высокого качества.

Глава 3 посвящена изучению особенностей развития соцветия пшеницы с нестандартными морфотипами колоса. В этой части работы диссертанту удалось показать, что гетерогенная группа многоколосковых линий на основе морфологической оценки, с применением методов световой и электронной микроскопии, с учетом особенностей развития соцветия, может быть разделена на три основных группы. Каждая группа включает формы со сходными генетическими нарушениями в развитии колоса. Обозначенные многоколосковые линии и линии со спиральным расположением колосков генетически различны и являются хорошим материалом для изучения генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы. Следует еще раз отметить высокое качество фотографий, представленных в данной главе.

Следующая глава посвящена изучению генетической регуляции многоколосковости у мягкой пшеницы *T.aestivum* L. и ржи посевной *S.cereale* L. В данной главе описаны результаты по выявлению генов, контролирующих развития соцветия, их точной локализации на картах хромосом. Построение карт хромосом выполнено с использованием молекулярных маркеров. Автору удалось впервые определить положение генетических локусов, которые контролируют многоколосковые фенотипы мягкой пшеницы на молекулярно-генетических картах хромосомы 2DS. Кроме того, в главе приведены результаты по изучению генетической регуляции формирования колоса у ржи. В работе использована линия из Петергофской (СПбГУ) генетической коллекции ржи, которая характеризуется многоколосковым фенотипом, сходным с таковым у пшеницы. Автору впервые удалось определить положение гена, контролирующего данный признак, на микросателитной карте хромосомы 2R. Сравнительный анализ показал, что сходные

гены ржи и пшеницы принадлежат одной группе ортологичных генов злаков, контролирующих развитие соцветия. Таким образом, полученные диссертантом результаты вписываются и подтверждают закон Н.И. Вавилова о гомологичной изменчивости и подтверждено, что использование явления синтении помогает выявлять соответствующие гены у еще не изученных близких видов.

Следующие две главы 5 и 6 посвящены изучению структурно-функциональной организации гена WFZP, контролирующего многоколосковый фенотип колоса у пшеницы. Автором проведена масштабная работа по идентификации, основанной на синтении, гена-кандидата на роль *mrs1* с использованием консервативных ортологичных генов злаков и COS-SSCP анализа. В итоге, основываясь на результатах молекулярно-генетического картирования и анализа нуклеотидных последовательностей, в работе сделано заключение, что WFZP-D и *Mrs 1* являются синонимами, а аллели *wfzp-D.1* и *wfzp-D.2* связаны с мутантным многоколосковым фенотипом мягкой пшеницы. Автору впервые удалось выделить ген, изменение структуры которого определяет формирование дополнительных колосков на уступах колосового стержня пшеницы. Основной функцией выявленного гена, по данным автора, является генетический контроль формирования цветковых меристем соцветия, а анализ структурной организации этого гена позволил определить функциональное значение домена AP2/ERF в определении архитектуры соцветия злаков. Автор уточняет функциональную роль гена WFZP, а именно он контролирует переход к установлению идентичности флоральных меристем базальной части колоска. О.Б. Добровольской изучен еще один ген *SHR2*, который также контролирует формирование соцветия. Мутации по двум генам фенотипически сходны, что может означать наличие общих функций. Автором для изучения взаимодействия был проведен классический генетический анализ. Результаты не выявили взаимодействия изучаемых генов, они действуют независимо на разных генетических путях. Таким образом, в ходе исследования удалось показать, что идентичность флоральной меристемы многоцветкового колоска пшеницы контролируется разными генами, которые действуют независимо.

В диссертации имеется общее заключение, в котором суммированы многочисленные результаты проведенного исследования и определено их место в изучении молекулярно-генетических механизмов формирования соцветия злаков. Обоснованность и достоверность заключений и выводов, сделанных в работе не вызывает никаких сомнений.

Следует отметить, что автору присущ ясный и логичный стиль изложения, способность четко и понятно донести свои мысли до читателя, написана работа хорошим русским языком. Исключение составляют единичные иностранные термины, например, паттерн, который вполне можно заменить русскими словами — характер, рисунок, тип. У оппонента не возникло фактически никаких замечаний. Даже количество опечаток в работе находится на уровне статистической погрешности.

В качестве дискуссии, а скорее как рекомендации для будущих исследований автора, хотелось бы пожелать активнее использовать современные методы молекулярной биологии и генной инженерии. Например, сейчас уже существует и работает в нашей стране целый арсенал методов, позволяющей доказать наличие взаимодействия на уровне

ДНК-белок, белок-белок и т.д. Кроме того, при изучении функции гена следует использовать подходы по выключению гена, например, на основе РНК-интерференции или CRISPER/Cas9. Однако, высказанные пожелания никак не умоляют общей высокой оценки работы. Оппоненту было очень приятно анализировать результаты классического генетического анализа. В наше время не так часто в работах можно встретить добротные генетические исследования с растениями, а не только анализ ДНК из пробирки. Несомненно, работа О.Б. Добровольской вносит серьезный вклад в генетику развития в целом и полученные автором результаты войдут в курсы лекций, читаемых в университетах.

Автореферат оформлен по всем правилам, в нем отражены основные положения диссертационной работы, полно представлен и отлично проиллюстрирован богатый экспериментальный материал, полученный в ходе экспериментальной работы. Название диссертации полностью отражает комплекс проведенных исследований. Работа выполнена на высоком методическом уровне, а полученные результаты являются крупным достижением в той области биологии, которая посвящена исследованию молекулярно -генетических механизмов формирования флоральных органов у растений.

Материалы диссертации были представлены на многочисленных всероссийских и международных научных мероприятиях и опубликованы в журналах списка ВАК, отечественных и престижных зарубежных журналах, часть из которых относятся к Q1 квартилю.

Заключение. Диссертационная работа Оксаны Борисовны Добровольской «Молекулярно-генетические основы морфогенеза соцветия пшеницы», представленная на соискание степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика, является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Добровольская Оксана Борисовна, заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 — генетика.

Официальный оппонент:

Лутова Людмила Алексеевна

д.б.н. профессор, профессор кафедры

генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского

Государственного Университета,

Санкт-Петербург сентябрь 2018г.

Подпись Лутовой Л.А. подтверждаю

ЛИЧНУЮ
ПОДПИСЬ
ЗАВЕРЯЮ



МЕТОДИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ