

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Оксаны Борисовны Добровольской «Молекулярно-генетические основы морфогенеза соцветия пшеницы», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Исследование генетического контроля морфогенеза соцветия является одной из фундаментальных задач генетики развития растений. Наиболее полно в этом отношении изучено модельное растение *Arabidopsis thaliana*, а среди экономически важных сельскохозяйственных злаков “большой тройки” - *Oryza sativa* L. и *Zea mays* L. Что касается мягкой пшеницы, в определенной степени исследована генетическая регуляция перехода от вегетативной фазы развития к генеративной, и совсем недостаточно – регуляция последующих стадий развития, инициации и дифференцировки органов соцветия. Это объясняется сложным составом и полиплоидной природой генома пшеницы и отсутствием до недавнего времени ее референсного генома. Современные программы улучшения зерновых злаков базируются на фундаментальных знаниях о генетической регуляции различных аспектов развития растений, особенно регуляции морфогенеза соцветия, строение которого влияет на их продуктивность. Использование в селекционных программах современных молекулярно-генетических подходов также стимулирует исследования генетической регуляции морфогенеза культивируемых растений. В связи с этим диссертационная работа О.Б. Добровольской, целью которой было изучение генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы, является **актуальной**.

Разносторонние исследования генетических механизмов, управляющих развитием соцветия пшеницы на стадии формирования колоска, с использованием методов микроскопии, анализа кариотипов, методов классической генетики и самых современных молекулярно-генетических методов, привели к получению **новых, теоретически значимых результатов**. Оксаной Борисовной Добровольской впервые были идентифицированы гены и QTL, определяющие формирование многоколосковых фенотипов мягкой пшеницы, определена их локализация на молекулярно-генетических картах хромосом, установлены их функции в развитии соцветия. Впервые в геноме мягкой пшеницы выделены гомеологи гена *WFZP* и изучена структурно-функциональная организация этих генов у диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы, показана их роль в развитии. Впервые показан вклад гомеологичных генов сложного аллополиплоидного генома в контроль морфогенеза соцветия. Впервые показано, что гены *WFZP* и *SHR2*, участвующие в установлении идентичности цветковых меристем многоцветкового колоска пшеницы действуют независимо на разных этапах развития колоска и принадлежат разным генетическим путям регуляции развития. Впервые экспериментально доказано наличие генов *RS*, участвующих в контроле развития колоска

пшеницы, и показано их взаимодействие с геном *SHR2*. **Достоверность полученных результатов и выводов** основана на тщательном подборе объектов исследования - линий пшеницы и ржи с разнообразными аномалиями развития и различного происхождения; адекватных экспериментальных подходах, применении различных методов для доказательства правомерности выводов. Важным обстоятельством, подтверждающим признание научных результатов О.Б. Добровольской, является их публикация в международных журналах, входящих в квартиль Q1, чему предшествует придирчивое рецензирование рукописей.

Очевидна и **практическая значимость** работы О.Б. Добровольской. В процессе работы была создана уникальная коллекция линий пшеницы и разработаны новые ДНК маркеры, которые могут быть использованы в работах по молекулярно-генетическому картированию генов и QTL у пшеницы и ее сородичей. Алгоритм исследования, использованный О.Б. Добровольской, подбор генетических моделей (ди-, тетра и гексаплоидных видов пшеницы с однотипными нарушениями морфогенеза) и комплекс современных методов анализа генома растений, в том числе методы сравнительной геномики, могут быть применены в дальнейшем для изучения генетической регуляции процессов развития у растений со сложными геномами или растений, геномы которых ещё не секвенированы.

Характеристика диссертации. Работа Оксаны Борисовны Добровольской представляет собой законченное исследование, отвечающее по оформлению всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям. Она изложена на 293 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав, в которых приведены результаты собственных исследований и их обсуждение, заключения, выводов, и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 56 рисунками и 4 таблицами. Список цитированной литературы включает 280 источников (из них 28 отечественных), имеющих прямое отношение к теме диссертации. Имеется также приложение, содержащее 12 таблиц и 12 рисунков.

Во введении автор обосновывает актуальность темы, отдельными разделами раскрывает степень разработанности темы и методологию исследования. Здесь же сформулированы цель и задачи, основные защищаемые положения и приводятся сведения, характеризующие личный вклад автора работы.

Обзор литературы постепенно вводит читателя в тему, начиная от ярко написанной эволюционной истории злаков и мягкой пшеницы, описания многоколосковых форм, особенностей развития соцветия злаков и заканчивая описанием имеющихся в литературе данных о генетической регуляции морфогенеза соцветия злаков. Из сведений, приведенных в литературном обзоре, следует, что существуют консервативные и специфические для отдельных таксонов механизмы регуляции морфогенеза соцветия, а генетические локусы, отвечающие за формирование ветвистого колоса у злаков, расположены в синтенных районах гомеологичных хромосом.

Учитывая особенности строения колоса пшеницы, предполагается наличие специфических путей регуляции его развития, что дополнительно актуализирует исследование Оксаны Борисовны.

В главе 2 «**Материалы и методы**» приводится впечатляющий список генотипов, вовлеченных в исследование. Собранная по всему миру коллекция линий пшеницы и ржи с нестандартными морфотипами колоса включает 27 линий различного происхождения. Для молекулярно-генетического картирования и тестов на аллелизм автором были созданы 13 популяций гибридов пшеницы, от 100 до примерно 160 растений в каждой популяции. В работе использовали 6 генотипов с нормальным развитием колоса, а также нулли-тетрасомные линии и делеционные линии (22), несущие делеции хромосом второй гомеологической группы. В главе 2 описаны условия выращивания растений и использованные методы, среди которых методы микроскопия, выделения и анализа ДНК и РНК, SSR и SSCP-анализы, построение молекулярно-генетических карт хромосом и картирование QTL, разработка новых SSR-маркеров, скрининг ВАС-библиотеки пшеницы и установление первичной структуры ДНК ВАС-клонов, С-дифференциальное окрашивание, флуоресцентная *in situ* гибридизация.

Результаты исследования изложены в следующих четырех главах. В **главе 3** дается характеристика линий с нестандартными морфотипами колоса. На основании анализа нарушений морфогенеза колоса на ранних стадиях развития, проведенного методами световой и электронной микроскопией, линии были разделены на три группы с однотипными нарушениями внутри каждой группы. По результатам этой работы были выделены генетические модели для исследования генетической регуляции морфогенеза колоса. В **главе 4** описаны результаты изучения генетической регуляции развития колоса у линий пшеницы и ржи с аномальным морфогенезом соцветия методами кариотипирования и молекулярно-генетического картирования. Убедительно показано, что генетический локус *Mrs1*, связанный с формированием многорядного колоса, ко-локализуется с локусами количественных признаков, контролирующими другие нестандартные морфотипы (ветвистый колос и горизонтальные колоски) на коротком плече хромосомы 2D. Замещение хромосомы 2D и делеции короткого плеча влияли на морфологию колоса. На хромосоме 2A также были локализованы QTL, связанные с развитием нестандартных фенотипов, но основной вклад в фенотипическое проявление признака, почти 50%, вносил QTL, расположенный на хромосоме 2D. Ген, определяющий монстрозный фенотип колоса у ржи, был картирован на хромосоме 2R. В **главе 5** изложен ход определения структурно-функциональной организации гена *mrs1*, основанного на синтении хромосом злаков, с помощью методов сравнительной геномики. С применением COS-SSCP маркеров был определен район синтении хромосомы 2D и хромосомам злаков, геномы которых хорошо изучены. Как наиболее вероятный ген-кандидат на роль

Mrs1 пшеницы был выбран ортолог гена *FZP*. Далее был проведен скрининг ВАС-библиотеки мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг, отобраны ВАС-клоны, включающие последовательности, гомологичные гену *FZP* риса, определена первичная структура трех ВАС-клонов, содержащих гомеологичные копии гена *WFZP* геномов А, В и D. Далее была изучена экспрессия трех гомеологичных копий гена *WFZP*, разработаны SSR-маркеры к *WFZP* локусам мягкой пшеницы и проведено секвенирование генов *WFZP-D*, *WFZP-A*, *WFZP-B* нормальных и многоколосковых линий пшеницы и выявлены мутации, вызывающие аномалии развития колоса. Результаты позиционного клонирования и выявление мутаций гена *WFZP*, ответственных за нарушение развития колоса представляются несомненным достижением диссертационной работы О.Б. Добровольской. В главе 6 описаны результаты изучения гена *WFZP* у диплоидных и тетраплоидных видов пшеницы. Ортологи гена *WFZP-A* впервые были выделены у этих пшениц и определены мутации, отвечающие за формирование аномального фенотипа.

В целом можно заключить, что Оксаной Борисовной Добровольской проведена серьезная работа, большая по объему и значительная по результатам. **Три научных положения, предъявленных к защите, без сомнения, обоснованы и доказаны результатами работы.** Убедительно показано, что аномалии развития колоса связаны с нарушениями установления идентичности флоральных меристем на ранних этапах развития соцветий. Автору удалось не только установить положение на хромосомах главных локусов, контролирующих развитие аномальных соцветий, но и выделить ключевой ген, регулирующий развитие колоса, изучить его структуру, определить мутации, определяющие развитие нестандартного фенотипа колоса, выявить вклад гомеологичных копий гена в фенотипическое проявление аномалий развития. Важным результатом работы представляется установление роли гена *SHR2* в специфической регуляции развития колоса у мягких пшениц.

Материалы автореферата и 21 опубликованных в журналах из Перечня ВАК РФ работ полностью отражают содержание диссертации. Работа О.Б. Добровольской прошла успешную апробацию на всероссийских и международных конференциях.

Выводы диссертации в полной мере отражают ее содержание. Степень обоснованности выводов и рекомендаций не вызывает сомнений.

При знакомстве с диссертационной работой не возникло каких-либо замечаний, относящихся к ее оформлению, изложению и анализу полученных научных результатов. Можно высказать пожелание автору более обстоятельно описать направление дальнейших исследований генетической регуляции морфогенеза колоса пшеницы и перспектив создания высокоурожайных сортов на основе полученных теоретических данных.

Заключение

Диссертация Оксаны Борисовны Добровольской «Молекулярно-генетические основы морфогенеза соцветия пшеницы», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченной и успешной научно-исследовательской работой, в которой автором получены новые оригинальные данные о генетической регуляции морфогенеза соцветия. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, методическому уровню работа соответствует п.9 "Положения о порядке присуждения учёных степеней", утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г., предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, безусловно, достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Ведущий научный сотрудник
лаборатории физиолого-биохимической
адаптации растений ФГБУН Сибирский институт
физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской
академии наук, д.б.н.

 /Осипова
Светлана Владимировна/

10.10.2018

Данные об авторе отзыва

Осипова Светлана Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений СИФИБР СО РАН

664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.


Тел.+7 (3952) 42-67-21

Факс +7 (3952)51-07-54

Сайт: <http://sifibr.irk.ru>

E-mail: matmod@sifibr.irk.ru



Подпись 
ЗАВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров 

10.10.2018г.