

## ОТЗЫВ

на диссертацию Добровольской Оксаны Борисовны

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МОРФОГЕНЕЗА СОЦВЕТИЯ ПШЕНИЦЫ

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук  
по специальности 03.02.07 – Генетика

Диссертация О.Б. Добровольской является законченным научным исследованием, посвященным вопросам генетической регуляции морфогенеза соцветия пшеницы. Качественные и количественные характеристики колоса пшеницы имеют непосредственное отношение к продуктивности этой важнейшей сельскохозяйственной культуры, поэтому проведенное глубокое фундаментальное исследование генетического контроля процессов развития соцветия пшеницы рано или поздно будет востребовано также и в прикладной растениеводческой науке.

Цель исследования сформулирована очень четко, диссертация построена по продуманной логичной схеме, которая предусматривает последовательное выполнение поставленных задач: сформировать коллекцию мутантов с нарушениями морфогенеза соцветия, тщательно описать их морфологические особенности с привлечением методов световой и электронной микроскопии, для каждого описанного морфотипа определить характер наследования, локализовать соответствующий генетический локус (QTL) на генетической карте пшеницы путем проведения скрещиваний, или с привлечением уже имеющихся популяций рекомбинантов. Заключительным этапом исследования является позиционное клонирование генов-кандидатов на основе синтении геномов злаков и выявление функционального полиморфизма мутантных генов – делеций, несинонимичных SNP, инсерций мобильных элементов.

Обзор литературы содержит исчерпывающее описание опубликованных источников, посвященных эволюционной истории злаков, включая феномен субгеномного доминирования. В обзоре подчеркивается, что в результате нескольких циклов аллополиплоидизации, каждый из которых сопровождался субгеномным доминированием, в современном геноме пшеницы сформировались наиболее стабильные районы, ассоциированные с хромосомами D-генома, и наиболее пластичные районы – хромосомы генома В. Этот факт имеет особое значение для интерпретации результатов исследования, изложенных в последующих главах. Описание строения цветка и соцветия злаков в обзоре литературы сопровождается схематическим

изображением многоцветкового колоска злаков, что помогает составить более ясное представление о морфологических особенностях цветка разных родов и триб этого семейства. Описания нетипичных для пшеницы, многоколосковых форм (multi-row spike, horizontal spikelets vertical sessile spikelets) в литобзоре, к сожалению, не дополнены схематическими изображениями, однако они прекрасно проиллюстрированы в Главе 3. В обзоре освещены этапы органогенеза побегов и соцветий у высших растений. Установлено, в частности, что основные процессы морфогенеза колоса пшеницы, протекают на 2–5-м этапах органогенеза растения, когда происходит переход к генеративной стадии развития, закладываются и дифференцируются органы соцветия.

Особое место в обзоре литературы занимает описание многоступенчатого процесса преобразования меристем соцветия в цветковые меристемы, приводятся определения ключевых свойств меристемы – идентичности и детерминированности. В тексте обзора указано, что *«идентичность меристемы определяется по типу зачатков органов, которые данная меристема иницирует»*. Относительно понятия детерминированности отмечается, что *«детерминированные меристемы представлены группами клеток, которые постепенно расходуются после инициации определенного (как правило, фиксированного) числа органов, а недетерминированные, напротив, состоят из само-возобновляемого пула клеток и продолжают иницировать структуры соцветия на протяжении жизненного цикла растений»*. Не совсем понятна фраза на стр. 52 о том, что *«для большинства цветковых растений детерминированность меристемы означает переход к установлению идентичности цветковой (флоральной) меристемы»*.

Рассмотрены вопросы генетической регуляции идентичности и детерминированности колосковых меристем, в том числе, описаны мутации генов *bd1* кукурузы и *FZP* риса, приводящие к формированию разветвленного соцветия.

По результатам проведенного обзора литературы сделан вывод, что генетическая регуляция развития соцветия пшеницы, в целом, изучена недостаточно, хотя исследования генетических основ формирования фенотипических характеристик соцветий экономически значимых зерновых культур, непосредственно связанных с элементами продуктивности, имеют очевидную практическую значимость. Приводятся ссылки на два литературных источника, свидетельствующих о том, что число зерновок в соцветии, которое зависит от строения и озерненности колоска, является одним из важных показателей продуктивности у пшеницы. Однако, было бы очень полезно осветить более подробно вопросы о селекционной значимости

изменчивости морфологических признаков колоса у пшеницы, возможно, существуют примеры практического использования мутантных форм (морфотипов) в селекции.

В главе 2 «Материалы и Методы» подробно описаны использованные в анализе линии пшеницы и ржи с нестандартным морфотипом колоса. Согласно Таблицам 1 и 2 Приложения, 27 линий, относящиеся к 10 различным морфотипам были получены для исследования из пяти отечественных и зарубежных научных центров. 7 популяций гибридов F<sub>2</sub> пшеницы и одна популяция гибридов ржи были использованы в ходе выполнения работы для изучения особенностей наследования изучаемых признаков, проведения тестов на аллелизм и молекулярно-генетического картирования. Впечатляет количество и разнообразие методов и подходов, использованных в работе: оценка фенотипов растений с использованием сканирующего электронного микроскопа, молекулярно-генетические методы, включая микросателлитный анализ, количественную ОТ-ПЦР, построение молекулярно-генетических карт и картирование генов, скрининг ВАС-библиотек, С-дифференциальное окрашивание.

В главе 3 приводится подробное описание групп мутантных линий пшеницы, включая историю их получения. Изначально автором выделено пять морфотипов многоколосковых линий диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов пшеницы. Для каждого морфотипа приведено детальное описание, проиллюстрированное прекрасными фотографиями и рисунками. Особенности развития соцветий многоколосковых линий мягкой пшеницы также изучены автором с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), после чего число групп с однотипными нарушениями морфогенеза сократилось до трех. Следует отметить, что полученные СЕМ-изображения строения соцветий мутантных линии (рис.3.12-3.17) являются исключительными по качеству и информативности иллюстрациями стадий дифференцировки колосковых и цветковых меристем.

Глава 4 посвящена генетическому анализу и молекулярно-генетическому картированию локуса, контролирующего признак MRS (multirow spike, многорядный колос). На стр. 129 указано, что *«Для определения хромосомной локализации гена был проведен модифицированный сегрегационный балк-анализ с использованием SSR-маркеров. .... Метод заключается в проведении генотипирования на части картирующей популяции, при этом ДНК индивидуальных растений не собирается в пулы, представляющие контрастные фенотипы, как это происходит при проведении сегрегационного балк-анализа по стандартной схеме, а анализируется отдельно. Основную часть анализируемых растений представляют рецессивные фенотипы»*. Вероятно, автор имеет в виду метод,

именуемый в англоязычной литературе, как Bulk Segregate Analysis (BSA) (Michelmore et al., 1991). Из приведенного абзаца не удается понять, в чем именно заключается модификация этого метода, примененного автором, и как именно она помогла обнаружить генетическое сцепление между Mrs-локусом и SSR-маркерами хромосомы 2D (стр. 131). Кроме того, не совсем понятно, стоит ли считать счастливым совпадением тот факт, что из 42 хромосом пшеницы для генотипирования популяций гибридов от скрещивания Ruc163 x So149 и Ruc167 x So149 были использованы только маркеры на хромосомах 2A, 2B, 2D и 4A, и при этом именно микросателлиты хромосомы 2D оказались сцепленными с Mrs-локусом.

Тем не менее, локус *mrs1* был успешно локализован автором на коротком плече хромосомы 2D, определены фланкирующие SSR-маркеры и установлено, что аллель 194-п.н. маркера Xwmc453 может служить диагностическим маркером признака MRS, находящегося под контролем рецессивного аллеля гена *Mrs1*.

В главе 4 автор приходит к важному выводу о том, что основной вклад в проявление признака «многоколосковость» мутантных линий мягкой пшеницы вносит генетический локус, расположенный в коротком плече хромосомы 2D. Определение точной локализации гена *mrs1* на молекулярно-генетической карте хромосомы 2D позволило перейти к следующему этапу исследования - идентификации гена-кандидата на роль *mrs1* на основе синтении с использованием консервативных ортологичных серий генов (Conserved Ortholog Set, COS) злаков (Глава 5).

В результате установленной синтении COS1-COS3-района хромосомы 2DS мягкой пшеницы, содержащего гена *mrs1*, хромосомы 7 риса (*O. sativa*), хромосомы 1 *B. distachyon* и хромосомы 2 сорго (*S. bicolor*), был определен список генов-кандидатов на роль *mrs1*, включающий 93 кодирующие последовательности (Таблица 5 Приложения), среди которых был идентифицирован наиболее вероятный кандидат - ген FRIZZY PANICLE (FZP), кодирующий белок транскрипционного фактора семейства APETALA 2 у риса. Для выделения полной последовательности гена *mrs1* автор произвел секвенирование трех ВАС клонов пшеницы, последовательности которых депонированы в базы данных GeneBank/EMBL, что является существенным дополнением к результатам, полученным в ходе работ по позиционному клонированию гена *mrs1*. В главе 5 автор убедительно показывает, что изменения первичной структуры идентифицированного в геноме пшеницы гена - ортолога *WFZP* приводят к формированию дополнительных колосков на уступах колосового стержня у многоколосковых линий. Удалось также определить основную функциональную роль гена *WFZP* в развитии соцветия пшеницы: генетический контроль установления идентичности цветковых

меристем соцветия. Идентифицированная последовательность гена *mrs1* (*WFZP-D*) позволила установить структуру генов-гомеологов *WFZP-A*, *WFZP-B* и *WFZP-D*, сравнить уровень их экспрессии, показать, что уровень транскриптов гена *WFZP-D* преобладает, что согласуется с основным вкладом генетического локуса *mrs1* в определении признака многоколосковость мягкой пшеницы. Описанный в Главах 4 и 5 успешный опыт молекулярно-генетического картирования и последующего позиционного клонирования гена-кандидата может использоваться в качестве модели для разработки стратегии поиска и клонирования генов, детерминирующих изменчивость морфологических и физиологических признаков у пшеницы.

Ортолог гена *WFZP-A* выделен в геноме тетраплоидной пшеницы *T. durum* (ВВАА), фенотип ветвистоколосых образцов *T. turgidum* также ассоциирован с мутантным аллелем локуса *WFZP-A* (Глава 6). Автором показано, что за формирование ветвистого колоса тургидного типа у растений *T. turgidum* convar. *compositum* (L.f.) Filat. отвечает аллель *wfzp-A/TtBH-A1*. Полученные результаты позволили сделать вывод о возможности появления ветвистоколосых форм *T. durum* в результате спонтанной гибридизации, которая могла произойти в Закавказье, или любом другом регионе, где *T. turgidum* произрастает совместно с другими видами пшеницы. Выводы, касающиеся эволюции видов пшениц, были также сделаны по результатам исследования автором образцов тетраплоидных видов пшеницы эволюционной линии Emmer, которые, как оказалось, несут структурные изменения в промоторном районе гена *WFZP-B*, аналогичные обнаруженным у мягкой пшеницы. У *Ae. speltoides*, геном S которого наиболее генетически близок геномам В и G пшеницы, и видов эволюционной линии Timopheevii эти изменения отсутствуют, откуда следует, что инсерция мобильных элементов произошла в эволюции пшеницы на стадии формирования тетраплоидного генома ВВАА эволюционной линии Emmer.

В целом, можно полностью согласиться с мнением автора, отраженным в Заключение, что полученные результаты внесли существенный вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов, управляющих развитием соцветия пшеницы на стадии формирования колоска. Стратегия, разработанная в настоящем исследовании, учитывающая синтению и особенности организации аллополиплоидных геномов злаков будет использована для изучения генетических механизмов, лежащих в основе формирования различных фенотипических признаков пшеницы и других растений.

Научные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, полностью обоснованы, их достоверность и новизна не вызывает сомнений.

В заключении хочу отметить, что диссертационная работа по объему исследованного материала, уровню методических подходов, новизне полученных результатов и их теоретической и практической значимости соответствует требованиям ВАК, а ее автор, Добровольская Оксана Борисовна, безусловно достойна присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Доктор биологических наук

*Stomov*

Е.К. Потокина

И.о. зам директора ВИР,

Главный научный сотрудник лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов ВИР, д.б.н. Потокина Е.К.



e-mail: [e.potokina@vir.nw.ru](mailto:e.potokina@vir.nw.ru), тел. (812) 312-51-61

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, 190000, Большая Морская, 42, 44.

*Подпись Е.К. Потокиной заверено  
Главным отделом кадров ВИР Е.А. Шенникова Е.А.*

