

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Сибирского
института физиологии и биохимии
растений Сибирского отделения
Российской академии наук, д.б.н.
профессор



В.К. Войников

«15» января 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Гордеевой Елены Ивановны «Генетическая регуляция фиолетовой окраски перикарпа зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность исследования. Рассматриваемая диссертация посвящена изучению генетической регуляции биосинтеза антоцианов - флавоноидов, определяющих фиолетовую окраску перикарпа зерна пшеницы. Интерес к изучению флавоноидов возрос с 1990-х годов в связи с открытием их антиоксидантных свойств. В настоящее время считается, что флавоноиды являются незаменимым компонентом пищи животных и человека, и наиболее активно эти вещества изучаются в растительных продуктах ежедневного потребления, таких как зерно, широко распространённые овощи и фрукты. Создание линий пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в зерне важно не только с точки зрения улучшения питательной ценности цельнозерновых продуктов, но и в связи с возможной ролью антоцианов в стрессоустойчивости растений пшеницы. В связи с указанными проблемами диссертационная работа Е.И. Гордеевой представляется актуальной и востребованной как в научном, так и практическом отношении.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 121 страницах. Состоит из введения, главы 1 «Обзор литературы», главы 2 «Материалы и методы», главы 3 «Результаты», главы 4 «Обсуждение», заключения, выводов, библиографического списка литературы, в котором 240 источников. Текст диссертации иллюстрирован 15 рисунками и 8 таблицами. Приложение содержит 3 рисунка и 8 таблиц.

Научная новизна работы. Диссертантом созданы новые изогенные линии яровой мягкой пшеницы с различными комбинациями генов *Pp*, регулирующих синтез антоцианов в клетках перикарпа. В коротком плече хромосомы 7A выявлен неизвестный ранее ген *Pp-A1*. Впервые показано, что регуляторные гены *Pp-1* и *Pp3* активируют структурный ген *F3h* в перикарпе зерновки пшеницы только совместно, тогда как для активации структурного гена *Chi* достаточно присутствие одного из доминантных генов (*Pp-1* или *Pp3*); ген *Pp-D1* может частично подавлять ген *Pp3*.

Практическая значимость работы. Показана эффективность использования маркер-контролируемого отбора при создании изогенных линий пшеницы. Полученные линии могут быть использованы в качестве доноров определённых аллелей *Pp* при селекционной работе и для тестирования новых образцов на присутствие комплементарных генов *Pp*, а также могут быть вовлечены в исследования влияния синтеза антоцианов в перикарпе зерна пшеницы на устойчивость растений к различным

стрессовым факторам. Предложены микросателлитные маркеры *Xgwm0044*, *Xgwm0111*, *Xgwm0437* для использования в селекционном процессе, направленном на введение гена *Pp-D1* в сорта пшеницы, и маркёры *Xgwm4204*, *Xgwm0817*, *Xgwm0445*, *Xgwm0312* при отборе генотипов, содержащих ген *Pp3*.

Общая характеристика диссертации

Во введении (стр. 6-10) автор обосновывает актуальность избранной темы исследования, формулирует цель работы и основные задачи, показывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы (стр. 11-42) обобщены сведения о флавоноидах зерна пшеницы, генетическом контроле их биосинтеза и генетических моделях, используемых для изучения локализации и функциональной организации генов пшеницы. В заключении к обзору литературы подчеркивается необходимость создания генетически маркированных линий для исследований генетической регуляции биосинтеза антоцианов.

В главе «Материалы и методы» (стр. 43-52) представлена схема проведения скрещиваний для получения изогенных линий, приведено описание линий пшеницы с различными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей генов *Pp*, используемых в работе, в том числе и полученных в результате её выполнения (6 линий). Приведены методы фенотипирования и генотипирования растений, анализ транскрипции, выделение и анализ содержания антоцианов, изложены методы статистической обработки результатов и компьютерного анализа.

В главе 3 (стр. 53-70) изложены результаты исследований. Совершенно очевидно, что была проведена значительная по объёму экспериментальная работа. С помощью гибридизации и комплексного отбора по фенотипическим и генотипическим признакам был получен набор изогенных линий мягкой пшеницы с различными комбинациями доминантных и рецессивных аллелей. Была показана возможность использования данных линий для тестирования генетического материала на присутствие комплементарных генов *Pp*. Было установлено, что линии яровой мягкой пшеницы, несущие доминантные аллели генов *Pp-D1* и *Pp3*, содержат антоцианов в зерновке больше, чем линии, содержащие хотя бы один из этих генов в рецессивном состоянии. Оценка уровня транскрипции генов биосинтеза антоцианов *F3h*, *Chi*, *TaMyc1* в перикарпе с помощью количественной ОТ-ПЦР показала, что для активации транскрипции гена *F3h* требуется присутствие доминантных аллелей двух генов *Pp-1* и *Pp3*, в то время как для гена *Chi* достаточно присутствие одного доминантного гена (*Pp-1* или *Pp3*). В работе было показано, что, вероятно, ген *TaMyc1* является геном *Pp3* на молекулярном уровне. Ген *Pp-D1* вызывает частичную супрессию гена *Pp3*.

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Фактический материал хорошо иллюстрирован рисунками и таблицами.

Завершают работу выводы, которые соответствуют цели и задачам исследования, аргументированы и объективно отражают полученные экспериментальные данные.

Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показан вклад автора в проведенное исследование, а также степень новизны и практическая значимость результатов исследований.

К сожалению, диссертационная работа не лишена недостатков. Следует отметить следующие:

1. Недостаточно аккуратное оформление цитированных источников.
- В ссылках в ряде случаев приводится только один автор из нескольких соавторов. Например, на стр. 6 и стр. 15 в ссылках на работы (Abdel-Aal, 2006) и (Trojan, 2014) требуется писать (Abdel-Aal et al., 2006) и (Trojan et al., 2014); на стр. 34 и 38 в ссылках на работы (Petruzza, 2013), (Gagne, 2006) и (Khlestkina, 2009b) необходимо указать (Petruzza et

al., 2006), (Gagne et al., 2006) и (Khlestkina et al., 2009b); на стр. 20 ссылка на работу (Li et al., 2003) неверна, ее необходимо было представить как (Li and Liao, 2003).

- Встречается неправильное или неточное оформление ссылок: На стр. 11 и стр. 16 ссылка на работу (Pascual-Teresa et al., 2010) в списке литературы приведена как (de Pascual-Teresa et al., 2010). На стр. 15 в таблице (3 столбец; 4 строка) приведена ссылка на работу (Арбузова и др., 1998), такой работы нет в списке литературы, но есть ссылка на работу (Arbuzova et al., 1998). На стр. 18 дана ссылка на автора (Коваль и др., 1997), а в списке литературы указано, что Коваль единственный автор. На странице 34 есть четыре ссылки на работу (Peer and Murphy, 2008), а в списке литературы приведено описание работы (Peer and Murphy, 2007). На странице 34 ссылка на работу Стаффорда (Stafford, 1974), в списке литературы этот автор обозначен как (Stafford, 1974). На стр. 44 табл. 5. приводится ссылка на работу (Tereshchenko et al., 2012a), однако в списке литературы есть только библиографическое описание работы (Tereshchenko et al., 2012).

- Отсутствует в списке литературы библиографическое описание следующих цитированных работ: на стр. 15 (Nalam et al., 2006); на стр. 20 (Islam, 2010); (Rechman et al., 2009); на стр. 26 (Hu et al., 1996, 2000); (Sakamoto et al., 2001); (Gong et al., 1999); (Llyod et al., 1992); (Kobayashi et al., 2002); (Deluc et al., 2006, 2008); (Walker et al., 2007); (Cutanda-Perez et al., 2009); (Saitoh et al., 2004); (Reddy et al., 1998); на стр. 32 (Ahmed et al., 2006); на стр. 34 (Saslowsky and Winkel-Shirley, 2001); на стр. 37 (Dolezel et al., 2012); (Huang et al., 2000); (Khlestkina, 2010b); на стр. 52 (Christie et al., 1994).

- В списке литературы в некоторых случаях нарушен алфавитный порядок. На стр. 108 ссылка (Pumphrey et al., 2007), на стр. 112 (Simon et al., 2010) и (Simoes et al., 2012). На стр. 99 ссылка на работу (Gunnaiah et al.) приведена не верно. Нет страниц и года издания работы.

2. Недостаточно обосновано применение статистических методов.

- Неизвестно оценивал ли автор нормальность распределения значений тех или иных признаков в экспериментах. Это необходимо было сделать для более точного выбора метода статистической обработки.

- В главе 2. подраздел 2.2.5 «Методы статистического и компьютерного анализа» указано, что для оценки достоверности различий между средними значениями использовался тест Манна-Уитни (U-test). Следует отметить, что данный критерий используется для двух независимых выборок. В работе же проводились множественные сравнения (10 пар) (приложения на стр. 119-120, таб. 1-8). Необходимо было применять метод, предназначенный для множественных сравнений, например ранговый анализ Краскела-Уоллиса или дисперсионный анализ с последующим множественным сравнением средних. Если же автор по тем или иным причинам считал правильным использование теста Манна-Уитни, необходимо было внести поправку на множественные сравнения.

- В таблицах приложения 1 и 8 указаны пары сравнения и уровень p в виде $p \leq 0,05$ и $p < 0,05$. Поскольку в результате теста должны быть вычислены конкретные значения достигнутого уровня значимости, их и надо было приводить.

- Непонятно, что приведено на рисунках 13, 14 и 15. Это средние и стандартные отклонения или медианы и 25-й и 75-й процентиля, или другое.

3. Для воспроизведения используемых в работе методов необходимо более подробное их описание. Например, на стр. 48 не указан материал, из которого изготовлены пробирки, в которых проводили гомогенизацию и последующее выделение ДНК. На стр. 52 описана методика определения содержания антоцианов спектрофотометрическим методом. О содержании антоцианов автор судит по оптической плотности (стр. 63), не используя калибровочные кривые или коэффициент молярной экстинкции. Хотя различия в оптической плотности (рис.13) очевидно значимы, сравнение линий по содержанию антоцианов “в 53-75 раз” не является корректным, так как

оптическая плотность не линейная величина, особенно при таких высоких значениях, как показано на рисунке 13. В списке литературы отсутствует ссылка на используемый метод.

Несмотря на указанные выше недостатки, следует заключить, что диссертационная работа Гордеевой Елены Ивановны «Генетическая регуляция фиолетовой окраски перикарпа зерна мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)» представляет собой оригинальный научный труд, интересна по содержанию и содержит ряд новых сведений о генетической регуляции биосинтеза антоциановых пигментов, определяющих фиолетовую окраску перикарпа зерна мягкой пшеницы. Выводы диссертационной работы экспериментально обоснованы. Диссертация в полной мере соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а соискатель Гордеева Елена Ивановна достойна присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Диссертация и отзыв обсуждены на межлабораторном научном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (протокол №1 от 15 января 2015 г).

Николай Владимирович Дорофеев, к.б.н., заведующий лабораторией физиолого-биохимической адаптации растений Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Лермонтова 132, а/я 317, г. Иркутск, тел. (3952) 424551, e-mail: dorofeev@sifibr.irk.ru

Светлана Владимировна Осипова, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиолого-биохимической адаптации растений Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Лермонтова 132, а/я 317, г. Иркутск, тел. (3952) 424551, e-mail: osipova@sifibr.irk.ru

Юрий Михайлович Константинов, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетической инженерии Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Лермонтова 132, а/я 317, г. Иркутск, тел. (3952) 424903, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Константинов Ю. М.,
Осиповой С. В.,

Подпись Гордеева Е. В.
ЗАВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров
Дорофеева Е. В.



15.01.2015 г.