

ФАНО РОССИИ



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
http: www.vigg.ru

03.05.2018 №112 -01-28/325

На № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора ФГБУН Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор
С.К. Абилев

«03» мая 2018 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук на диссертационную работу **Киселевой Антонины Андреевны** на тему «Локализация и взаимодействие генов В-генома мягкой пшеницы, индуцирующих колошение», представленную к защите в диссертационном совете Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07- генетика

Актуальность исследования

Вид *Triticum aestivum* L. распространен в широком диапазоне климатических условий от 67° С. ш до 45° Ю. ш. Приспособленность его к такому разнообразию окружающей среды обеспечивается целым комплексом генов, в частности системой генов, регулирующих время перехода от вегетативной к генеративной стадии развития (формированию колоса и инициации цветения). Ключевые гены этой системы - гены *VRN*, определяющие тип развития, и гены *PPD-1*, определяющие чувствительность растений к продолжительности светового дня. Регуляция времени цветения и созревания позволяет растениям избегать экзогенных стрессов, вызванных агроклиматическими условиями выращивания и проявлять большую пластичность в контрастных регионах возделывания. Известно, что выявленные на сегодняшний день гены/аллели, контролируемые сроки колошения не описывают полностью всю изменчивость этого признака. Кроме того недостаточно изучены взаимодействия и механизмы регуляции комплекса этих генов.

Гены, контролирующие время колошения локализуются на гомеологичных хромосомах А, В и D геномов и вносят различный вклад в формирование признака, экспрессируясь с разной интенсивностью в разное время года и разное время суток. Поэтому идентификация неизвестных ранее генов и их аллелей, исследование взаимодействия комплексов генов, регулирующих сроки колошения одного из геномов пшеницы – генома В, чрезвычайно актуальны как для решения фундаментальных задач, так и для практического применения

Научная новизна работы.

Ряд результатов полученных диссертантом являются **новыми** и **носят приоритетный характер**. Автором выявлен, локализован и охарактеризован новый неизвестный ранее аллель гена *PPD-1B*, участвующий в регуляции времени колошения. Представлены структурные отличия последовательности этого аллеля от известного доминантного аллеля *Ppd-1Ba* и от аллеля с увеличенным числом копий. Показано, что вновь выявленный аллель, *Ppd-1Ba^{cnv}*, характеризуется не структурными изменениями, а увеличенным числом копий гена *Ppd-1Ba*. На основании анализа промоторов генов *PPD-1 in silico* выявлены транскрипционные факторы специфичные исключительно для гена *PPD-1B*. Впервые выдвинуто предположение, что гены *MADS-box* регулируют экспрессию аллеля *Ppd-1Ba* с увеличенным числом копий. Предложен механизм экспрессии этого аллеля, приводящий к снижению чувствительности растений к фотопериоду и запуску процесса раннего цветения.

Автором проведен анализ суточной экспрессии восьми генов инициации цветения у почти изогенных линий и их родителей – поздно и рано переходящих к цветению. Обнаружена статистически значимая корреляция между распределением экспрессии у *Ppd-1Ba* и *PHYC* в ночной период у нечувствительных к фотопериоду линий. Проведен анализ *in silico* промоторной области генов фитохромов (*PHYC*), который выявил сайты связывания регуляторов ответа, к которым относятся и *PPD-1* гены. В результате анализа полученных данных, автором впервые выдвинуто предположение, что экспрессия доминантного нечувствительного к фотопериоду аллеля *Ppd-1Ba^{cnv}* положительно регулирует экспрессию *PHYC* в темное время суток

SNP- генотипирование популяции рекомбинантных инбредных хромосомных линий и QTL- анализ позволили автору выявить в прицентромерном районе хромосомы 5В неизвестный ранее локус, влияющий на инициацию колошения. Сравнение кодирующих последовательностей этой части хромосомы с кодирующими последовательностями других видов злаков и последующим анализом консервативных доменов найденных генов, позволило предложить гены – кандидаты для выявленного локуса. Анализ генов-кандидатов определил, что наиболее вероятный из них – *FHY3/FAR1*, который, как предполагает автор, участвует (возможно, через передачу сигнала от фитохромов) во взаимодействии *Ppd-1Ba^{cnv}* и *PHYC*.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Результаты, полученные в работе Киселевой А.А., расширяют известные границы знаний о генетических механизмах, регулирующих у мягкой пшеницы такой важный адаптивный признак как сроки начала колошения. Автором получены новые данные по взаимодействию генов и их регуляции. Выявлены транскрипционные факторы, регулирующие экспрессию ключевых генов. Детально изучена структурно-функциональная организация одного из ключевых генов, контролирующего переход организмов к генеративной фазе.

Полученные в диссертационной работе результаты, могут служить основой для продолжения фундаментальных исследований в области взаимодействия генов, их экспрессии и регуляции, а также изучения сигнальных механизмов управления.

Исследованные в работе линии с выявленным в них доминантным аллелем *Ppd-1Ba^{cmv}*, а также рекомбинантные инбредные хромосомные линии, несущие идентифицированный автором неизвестный ранее локус на хромосоме 5В, участвующий в регуляции начала сроков колошения пшеницы, могут быть включены в селекционные программы по созданию высоко адаптивных сортов с заданными сроками колошения.

Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, главы с изложением результатов собственных исследований, главы с обсуждением полученных результатов исследования, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

Работа изложена на 160 страницах печатного текста, включает 31 рисунок, 4 таблицы и 6 приложений. Список цитированной литературы включает 308 источников.

Во Введении четко обоснована актуальность темы исследования и подробно представлены разделы, в которых нашли отражение степень проработанности темы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, сведения об апробации работы, публикациях и выступлениях на научных конференциях.

Цель исследования и задачи сформулированы корректно; положения выносимые на защиту базируются на основных результатах диссертационного исследования.

Глава 1. (Обзор литературы) Глава состоит из трех частей. В ней приводится подробная информация о генетических механизмах инициации цветения у модельного растения – арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*. Обсуждаются генетические механизмы различных путей регуляции инициации цветения. Подробно рассматриваются генетические механизмы, регулирующие сроки перехода от вегетативной к генеративной стадии развития у мягкой

пшеницы. Описываются гены *VRN*, *PPD-1*, гены суточных ритмов, фитохромы и фитогормоны, микро РНК и другие гены, ассоциированные со временем колошения у пшеницы. Так как диссертационная работа посвящена исследованию генов В-генома, то автор детально рассматривает известные механизмы действия и регуляции генов В-генома мягкой пшеницы, контролирующих сроки перехода растений пшеницы к генеративной стадии развития. В обзоре процитировано большое количество работ, в том числе и последних лет, при этом обзор представляет собой компактный целостный текст.

Глава 2 (Материал и методы) В полной мере отражает материалы исследования, включая описание почти изогенных линий мягкой пшеницы и рекомбинантных инбредных линий с замещённой хромосомой 5В от вида *T. dicoccoides*. Методы описаны подробно и четко и представляют собой современные и высокоэффективные технологии, высокого международного уровня - амплификация и разделение фрагментов ДНК, клонирование и секвенирование фрагментов ПЦР, биоинформатический анализ промоторов, количественная оценка экспрессии генов, SNP генотипирование, создание генетической карты и QTL анализ, BLAST анализ. Содержание главы свидетельствует о большой работе, проведённой автором по подбору и освоению различных методов исследования, а также то, что автор в совершенстве владеет ими.

Глава 3 (Результаты) Состоит из восьми разделов. В начале главы автор представляет проведенную им оценку аллельного состояния генов *VRN-1* и *PPD-1* у почти изогенных линий (NILs) и их родительских сортов и показывает, что выявленные аллели не влияют на различие исследуемых линий по времени колошения. Для поиска неизвестных ранее аллелей/генов, вызывающих различие линий по срокам колошения, автором было проведено SSR-генотипирование этого материала. В результате была установлена область генома на хромосоме 2В, которая и определяла искомые различия. В этой области расположен ген *PPD-1B*. Секвенирование последовательностей с *PPD-1B* позволило автору выявить неизвестный ранее доминантный аллель *Ppd-B1a^{cnv}*, влияющий на изменчивость времени колошения у NILs. Измерением копийности, структурно-функциональным анализом гена у этого аллеля выявлено увеличенное число копий, а также продемонстрировано его структурное отличие от других доминантных аллелей *PPD-1B* - однонуклеотидные замены и инсерция/делеция. Для выявления факторов, участвующих в регуляции исключительно *PPD-1B*, автором биоинформатически были проанализированы промоторные области генов *PPD-A1*, *PPD-1B* и *PPD-D1*. Сопоставление данные позволило автору выдвинуть предположение, что основную роль в нарушении экспрессии *Ppd-B1* с увеличенным числом копий выполняют *MADS*-гены. На основе этих данных, автор предполагает, что аллель *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий продолжает экспрессироваться в

темный период суток из-за того, что количество специфичного для данного гена репрессора уменьшается в пересчете на одну копию гена.

На основании корреляции распределения суточной экспрессии разных генов, отвечающих за время колошения, была выявлена значимая корреляция между *Ppd-B1a* и *PHYC* в течение темного времени суток у нечувствительных к фотопериоду линий. Анализ *in silico* последовательностей промоторов генов *PHYC* позволил выявить вероятные сайты связывания транскрипционных факторов типа RR и PRR, к которым относятся гены *PPD-1*. Полученные результаты позволили автору предположить, что *Ppd-B1a^{cnv}*, экспрессируясь ночью, может положительно регулировать экспрессию *PHYC* в темное время суток.

Выявление аллеля *Ppd-B1a* с увеличенным числом копий не покрывает всю изменчивость по времени инициации колошения у исследуемых линий, поэтому автором было проведено SNP-генотипирование популяции рекомбинантных инбредных хромосомных линий (RICL), различающихся по времени колошения, и построена генетическая карта хромосомы 5B. В результате QTL анализа, в прицентромерной области хромосомы 5B выявлен неизвестный ранее локус, участвующий в регуляции перехода растений к генеративной фазе. Сравнение последовательностей с SNP, локализованных в этой части хромосомы, с последовательностями некоторых видов злаков из баз данных позволило выявить гены-кандидаты, регулирующие сроки колошения, один из них - *FHY3/FAR1*. По сайту связывания в промоторе и характеру суточной экспрессии *FHY3/FAR1* также является наиболее вероятным геном-кандидатом, вовлеченным в контроль времени цветения. Выдвинута гипотеза о положительной обратной связи между *Ppd-B1a^{cnv}* и *PHYC*, в которой участвуют гены *FHY3/FAR1*.

Результаты работы тщательно документированы рисунками, таблицами и приложениями.

Глава 4 (Обсуждение) посвящена обсуждению результатов, полученных в диссертационной работе.

Заключение. В разделе подводится итог выполненного исследования, рассмотревшего важные детерминанты, контролирующие индукцию колошения/ цветения у мягкой пшеницы. Подчеркнуто, что локусы, выявленные с использованием различных систем маркеров на хромосомах В-генома, связаны с индукцией генеративной фазы развития пшеницы

Выводы. По результатам проведенных исследований сформулировано пять выводов, которые логически вытекают из результатов выполненного исследования и соответствуют поставленным задачам.

Достоверность результатов исследования.

Антониной Андреевной Киселевой исследован обширный уникальный материал. Используются методы, представляющие собой современные высокоэффективные технологии. Все

данные собраны в таблицы и приложения, которые позволяют проверить правильность выводов, сделанных автором. Результаты исследования и выводы высоко достоверны и не вызывают сомнений. Диссертация написана хорошим научным языком, аккуратно оформлена.

Автореферат диссертационной работы А.А. Киселевой и опубликованные ею работы полностью отражают содержание диссертации.

Несмотря на большое теоретическое и практическое значение полученных результатов, считаем целесообразным высказать ряд замечаний.

1. На с.8 последний абзац автор пишет, что гены влияют на формирование времени колошения. Смысл высказывания понятен. Но, гены влияют на формирование признака, а не времени.
2. Автор часто использует выражение «..аллель ...*положительно* влияет на время колошения» (например, с. 11, строка 13), из чего не ясно увеличивается или сокращается время развития.
3. Автор в ряде мест диссертации не называет район гена, в котором произошла делеция или однонуклеотидные замены (например, с. 31, последний абзац).
4. Распределение значений LOD представлено не в таблице 2, на которую ссылается автор, а на рис. 25, правая часть рисунка (с. 86-87)
5. На рис. 25 не введены обозначения всех частей рисунка (например, нет описания, что обозначает зеленый прямоугольник)

Перечисленные замечания, однако, не снижают высокой оценки диссертационной работы А.А. Киселевой

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы.

Результаты работы А.А. Киселевой могут быть использованы в научно-исследовательских лабораториях Института молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН (Москва), Института общей генетики им. Вавилова РАН (Москва) и других институтах и лабораториях, специализирующихся в области генетики растений. Они могут быть рекомендованы для включения в лекционные и практические курсы высших учебных заведений – биологических факультетов университетов и институтов России

Заключение.

Диссертация КИСЕЛЕВОЙ Антонины Андреевны «Локализация и взаимодействие генов В-гена мягкой пшеницы, индуцирующих колошение» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение в области генетики растений. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке

присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемого к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Считаем, что автор диссертации – КИСЕЛЕВА Антонина Андреевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв ведущей организации о научно-практической ценности диссертации **Киселевой Антонины Андреевны** на тему «Локализация и взаимодействие генов В-генома мягкой пшеницы, индуцирующих колошение» обсужден на заседании научного семинара отдела генетики растений ФГБУН Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук 13 апреля 2018 г (протокол №3 от 13 апреля 2018 г.)

Данные об организации:

Федеральное государственное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, адрес: 119991, Москва, ГСП-1, ул. Губкина, д. 3; телефон: 499 135-62-13, электронный адрес: iogen@vigg.ru; сайт: www.vigg.ru

Отзыв составлен:

зав. лабораторией генетических основ идентификации растений
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
доктором биологических наук
А.Ю. Драгович

Подпись д.б.н. А.Ю. Драгович удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН ИОГен РАН
доктор биологических наук
О.А. Огаркова



Сведения о составителе отзыва:

Драгович Александра Юрьевна, доктор биологических наук, зав. лабораторией генетических основ идентификации растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

Адрес: РФ, 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д.3

Раб. тел.: 8(499)135-5362; e-mail: dragovich@vigg.ru; dragova@mail.ru