

# 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](mailto:iogen@vigg.ru)  
<http://www.vigg.ru>

№112

На №

### О Т З Ы В

официального оппонента по диссертационной работе Логиновой Дины Борисовны на тему: «МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МЕЙОТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ ГИБРИДОВ (ABDR,  $4x=28$ )», представленной к защите в диссертационном совете Д 003.011.01 на базе ФГБОУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

#### Актуальность темы диссертационной работы

Явление полиплоидии широко распространено и представляет собой один из основных механизмов эволюции растений. Важнейшую роль в образовании полиплоидов играет восстановление фертильности гибридов  $F_1$ , происходящее за счет удвоения числа хромосом. Наиболее перспективным методом получения жизнеспособных и фертильных аллополиплоидов считается слияние нередуцированных гамет, образующихся в процессе мейотической реституции. Изучению ее механизмов посвящены многие исследования, проводимые в основном на видах двудольных растений. В то же время, у однодольных, к которым, в частности, относится мягкая пшеница, феномен мейотической ядерной реституции изучен недостаточно. Не вызывает сомнения, что исследование механизмов формирования нередуцированных гамет у пшеницы и ее гибридов, определение факторов, влияющих на этот процесс имеет не только теоретическое, но и практическое значение, поскольку создание фертильных аллополиплоидов является важнейшим этапом переноса хозяйственно-ценных признаков от других диких или культурных видов в геном мягкой пшеницы. В связи с этим, АКТУАЛЬНОСТЬ диссертационной работы Логиновой Дины Борисовны, посвященной изучению мейотических механизмов восстановления фертильности у гибридов  $F_1$  линий мягкой пшеницы (с разными вариантами замещений хромосом пшеницы хромосомами ржи) и рожью посевной не вызывает сомнений.

#### Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа Логиновой Д.Б. построена по стандартному плану и состоит из оглавления, списка сокращений, введения, глав материалы и методы, результаты, обсуждение, заключения, выводов и списка литературы.

Во введении диссертант обосновывает актуальность исследования, описывает степень разработанности темы, формулирует цель и задачи работы, аргументирует ее научную и практическую значимость.

Первая глава посвящена обзору литературы и состоит из нескольких разделов. В первом разделе рассмотрено явление полиплоидии у растений; описаны ее типы, механизмы возникновения и особенности мейоза; рассматриваются преимущества полиплоидии. Отдельный раздел посвящен описанию генетических и эпигенетических модификаций родительских геномов при образовании полиплоидных форм. Далее автор переходит к рассмотрению мягкой пшеницы: происхождения и особенностям организации ее субгеномов. В качестве небольшого замечания следует указать, что субгеном D никогда не считался «основным/ pivotal» геномом полиплоидной пшеницы (стр. 25); функцию базового генома выполняет субгеном A, тогда как субгеном B рассматривается как «дифференциальный».

Далее диссертант рассматривает locus *ph1*, а также другие локусы, участвующие в генетическом контроле мейоза пшеницы; описана история обнаружения *ph1* локуса, его локализация и обсуждаются гипотезы о механизмах функционирования. Хочется, однако, отметить, что впервые *ph1* locus был описан в 1958 году, т.е. примерно на 20 лет раньше, чем в процитированной в диссертации работе (при том, что соответствующие публикации цитируются в следующем разделе работы). Помимо этого, делеционные линии, включая *ph1b* и *ph1c*, были получены позже, чем 1977-1978 гг, так что картировать этот locus в «области перекрытия двух делеций *ph1b* и *ph1c*», в тот период было невозможно. Данное замечание, однако, носит частный характер и относится к стилю изложения материала, а не к его смыслу.

В следующем разделе разбираются способы расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы, в частности, перенос генов с помощью отдаленной гибридизации. Особое внимание автор уделил пшенично-ржаным транслокациям и замещениям. Раздел написан интересно и достаточно подробно. Последний раздел «Обзора литературы» посвящен анализу мейотической реституции у растений: на конкретных примерах подробно рассмотрены основные механизмы образования нередуцированных гамет, описаны особенности их проявления, перечислены основные мутации, приводящие к формированию нередуцированных гамет в первом или втором делении мейоза у разных видов растений. Данные по мутациям обобщены в двух таблицах, что существенно упрощает понимание материала. Раздел завершается анализом существующей информации о механизмах реституции генома пшеницы и ее гибридов. Небольшое замечание к этому разделу относится к обозначению вида *T. crassum* (стр. 50). Это название – синоним *Ae. crassa*, который принят современными систематиками.

Содержание главы «Обзор литературы» обобщено в разделе «Заключение»; здесь же сформулированы основные задачи работы и их связь с уже известными фактами, обоснованы методы исследования и выбор объектов.

Во второй главе рассмотрены материалы и методы исследования. Обращает на себя внимание большой объем проделанной автором работы и использование ею самых современных молекулярно-цитогенетических методов, позволивших получить четкие и достоверные результаты. Не понятно только, зачем диссертант включила раздел «Приготовление давленных препаратов митотических хромосом» в главу «Материалы и методы», если в диссертации анализа митотических хромосом не проводилось вообще.

В третьей главе диссертации излагаются результаты исследования.

На первом этапе автор анализирует влияние пшенично-ржаного замещения на характер мейоза у гибридов. Д.Б. Логинова показала, что амфигаплоидные растения характеризуются разными типами аномального мейоза, причем соотношение мейоцитов с разными типами поведения хромосом зависело от типа замещений у гибридов. Поведение хромосом в четырех обнаруженных типах аномального мейоза, выявленных при помощи стандартного окрашивания ацетокармином, описаны очень подробно и иллюстрируются микрофотографиями высокого качества. Приведены данные о соотношении частот мейоцитов с разными типами аномального мейоза в гибридах, отличающихся спектрами замещений хромосом. Диссертант установила, что в гибридах с замещением  $2R(2D)_1 \times R$ , характеризующихся преимущественно «редукционным типом деления», мейотической реституции не наблюдалось, а в четырех других гибридных в ряду пыльников происходило формирование диад, которые в конце созревания микроспороцитов могут давать фертильную пыльцу.

Следующий этап работы Д.Б. Логиновой посвящен исследованию поведения хромосом с использованием методов FISH и иммуноцитохимии для прямой визуализации динамики микротрубочек и изменений организации хромосом и их центромерных районов при прохождении разных стадий мейоза. В качестве контрольного эксперимента сначала был проанализирован митоз и мейоз у родительских видов пшеницы и ржи. Поведение микротрубочек изучали с использованием антител к  $\alpha$ -тубулину, организацию, динамику хромосом и архитектуру кинетохора анализировали с помощью антител к фосфорилированному гистону H3Ser10 и кинетохорному белку CENH3. Для визуализации организации ДНК в области центромеры на каждом из этапов деления проводилась гибридизация *in situ* с центромероспецифичными зондами pAet6-09 (пшеницы) и pAwRc (ржи). Особенности всех стадий митоза и мейоза у родительских видов подробно описаны и наглядно проиллюстрированы микрофотографиями высокого качества, что позволило получить надежные характеристики для их определения.

Полученная информация была в дальнейшем использована для сравнительного анализа разных типов аномального мейоза у амфигаплоидов. Для каждого типа приведены подробные описания формирования веретена деления, изменений хромосом и их центромерных районов на каждой стадии деления, проиллюстрированные микрофотографиями, а также указаны их отличия от нормального мейоза. Показано, что по основным характеристикам «редукционный» и «редукционно-эквационный» типы мейоза соответствуют мейотическому, при этом для каждого из них были характерны определенные типы отклонений. «Эквационный» тип деления по основным характеристикам соответствовал митотическому, за исключением компактизации хромосом и распространения сигнала H3Ser10 на всю длину хромосом. Механизм мейоза амфигаплоидов с блокированием первого деления мейоза, чаще других наблюдавшийся в гибридах  $5R(5D) \times R$ , был уникальным, отличаясь от мейоза и от митоза.

Среди гибридов  $F_1$  4-х гибридных комбинаций было выявлено несколько фертильных растений, отличавшихся по числу завязавшихся зерен и их всхожести; растения  $2R(2D)_1 \times R$  были полностью стерильными. Потомство растений  $F_2$  разных гибридных комбинаций показало значительную изменчивость по фертильности и агрономическим признакам.

В заключительной – четвертой главе диссертации – «Обсуждении», автор рассматривает вопросы генетического контроля восстановления фертильности у пшенично-ржаных гибридов в

свете имеющихся в литературе данных. Автор высказывает предположение, что хромосома 2D пшеницы может нести ген(ы), участвующие в регуляции реституции, поскольку в отсутствие этой хромосомы нередуцированных гамет не образуется. Автор приводит опубликованные данные, свидетельствующие о возможном участии других хромосом 2-й гомеологической группы в регуляции реституции и влиянии генотипа второго родителя на этот процесс. В связи с тем, что в мейоцитах гибридов 2R(2D)1xR с редукционным типом деления встречалась только монополярная ориентация кинетохоров, Д.Б. Логинова предполагает, что гены, локализованные на хромосомах 2-й группы, могут участвовать в определении мейотической структуры кинетохора.

Поскольку гибриды 1Rv/1A и 6R/6A характеризовались повышенной частотой мейоцитов с эквационным типом расхождения хромосом, а также частичной фертильностью, диссертант делает вывод о возможном участии генов, локализованных на этих хромосомах, в регуляции реституции. Эти гены, возможно, контролируют митотическую структуру кинетохора, а их действие зависит от генотипа растения. Не исключено, что на других хромосомах также могут находиться активные гены, участвующие в регуляции реституции.

Следующий раздел главы «Обсуждение» рассматривает вопрос о том, какой именно механизм(ы) может лежать в основе реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению этой проблемы, четкого понимания механизмов реституции нет, что обусловлено сложностью данного объекта. Использование адекватной модельной системы, а также применение современных молекулярно-цитогенетических методов позволило диссертанту подробно охарактеризовать четыре самостоятельных типа деления мейоцитов и среди них выявить два основных механизма формирования нередуцированных гамет, происходящего в первом делении мейоза: эквационное разделение хромосом в МI и формирование монополярного веретена деления. Механизм реституции посредством эквационного разделения хромосом МI был ранее изучен и описан для межвидовых и межродовых гибридов пшеницы. В то же время, механизм реализации реституции за счет образования монополярного веретена с последующим разделением хроматид во втором делении у гибридов пшеницы ранее не был известен. Возможно, это обусловлено тем, что данный тип деления характерен только для пшенично-ржаных амфигаплоидов, тогда как другие авторы работали с гибридами пшеницы и *Aegilops*, с отличающимся механизмом образования нередуцированных гамет.

Далее Д.Б. Логинова рассматривает особенности эквационного деления, сочетающего характеристики митоза и мейоза, в свете особенностей организации хромосом и их центромерных районов. В этом разделе диссертант опирается на опубликованные другими авторами данные по молекулярным механизмам поддержания когезии и разделения сестринских хроматид и центромерных районов. На основе их обобщения выдвигается гипотеза о том, какие именно молекулярные механизмы могут отвечать за расхождение хромосом у пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления. Анализ опубликованных в литературе данных о феномене монополярного веретена и возможных механизмах его формирования приводит диссертанта к заключению, что вероятной причиной реституции в этом случае может быть инактивация Cdc2/CDK1 киназы.

В заключительном разделе «Обсуждения» рассмотрены вопросы формообразования и продуктивности гибридов  $F_2$ . В частности, отмечена зависимость продуктивности от генотипа гибрида, в частности, от типа замещения хромосом.

Заключение дает краткое резюме диссертационной работы, основные положения которой суммированы в 6 выводах. В конце диссертации приводится список литературы, включающий 328 источников, из них 17 – на русском языке.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских лабораториях, специализирующихся в области генетики, в частности, вопросах возникновения и эволюции пола у растений, при чтении лекций и проведении спецкурсов в научно-образовательных учреждениях, в том числе на кафедре генетики МГУ, НГУ и СПГУ, ТСХА и других высших учебных заведений.

#### Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения диссертационной работы Д.Б. Логиновой опубликованы в 10 печатных работах, в том числе 5 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты работы были представлены на 4 российских и одной международной научных конференциях. Содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате.

#### Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

Диссертация Д.Б. Логиновой написана хорошим литературным языком, оформлена в соответствии с рекомендациями ВАК. При прочтении рукописи было обнаружено лишь небольшое количество ошибок и опечаток, основные из которых приведены ниже:

- В списке сокращений следовало дать пояснения к символу 1Rv (хромосома 1R от сорта Вятка), поскольку его можно ошибочно трактовать как хромосома 1R *S. vavilovii*;
- По всему тексту диссертации, за редкими исключениями, для всех видов тетраплоидной пшеницы использовано общее название *T. turgidum*. С другой стороны, один и тот же сорт, например Langdon, относили как к *T. turgidum*, так и *T. durum*. При использовании одного видового названия для всех тетраплоидных пшениц обязательно следует приводить название конкретного подвида, о котором идет речь.
- Происхождение *T. aestivum* от естественной гибридизации тетраплоидной пшеницы и *Ae. tauschii* было показано еще в 20-х гг. XX века, поэтому ссылка на работы, опубликованные в 2011-2012 гг. (стр. 5, 22) несколько не корректна. Сходным образом, преимущественная экспрессия рРНК генов на хромосомах В-генома мягкой пшеницы была установлена еще в 80-х гг., т.е. существенно раньше, чем в процитированной диссертантом работе 2013 года (стр. 26).
- По современным правилам при написании геномных формул аллополиплоидных видов вначале приводится геномный символ вида – донора цитоплазматического генома. Таким образом, геномная формула твердой пшеницы должна писаться ВВАА, а мягкой пшеницы – ВВАADD (стр. 22).
- Генетическая классификация хромосом мягкой пшеницы была впервые опубликована в 1954, а не 1969 году.

- Диплоидных видов *Aegilops*, носителей В-генома, в природе не существует. Таким образом, нельзя писать ...«происхождением D-генома - в результате древнего события гибридизации растений с А и В геномами» (стр. 25).
- Следует писать «транслокационных», а не «транслоцированных» линий (стр. 29).
- При обсуждении гаметоцидных генов следовало сослаться на работы Т.Р. Endo, внесшего наиболее существенный вклад в их выявление, исследование механизмов действия и практическое использование (стр. 31).
- Несколько неудачно сформулирована фраза «изменение веретена в метафазе II наблюдалось как одно слитное веретено» (стр. 40).
- Нельзя использовать термин «цитотип реституции» (стр. 55, 103 и др.). Согласно определению, цитотип – это хромосомная раса вида (например, тетраплоидный и гексаплоидный цитотипы *Ae. crassa*).

Приведенные выше замечания, однако, не снижают высокой оценки диссертационной работы Д.Б. Логиновой.

### Заключение

Диссертационная работа Логиновой Д.Б. на тему «Молекулярно-цитогенетический анализ мейотических механизмов восстановления фертильности у пшенично-ржаных гибридов (ABDR,  $4x=28$ )» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершующую научно-квалификационную работу, а её автор Логинова Дина Борисовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

14 сентября 2016 г.

Бадаева Екатерина Дмитриевна,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории генетических основ  
идентификации растений  
доктор биологических наук  
по специальностям  
03.01.03 – молекулярная биология и  
03.02.07 – генетика

Е.Д. Бадаева

e-mail: *katerina.badaeva@gmail.com*  
Tel. 8(499) 135-04-60

Подпись  
удостоверяю

Ученый секретарь ИОГен РАН  
доктор биологических наук



Огаркова О.А.