

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертационной работе Логиновой Дины Борисовны «Молекулярно-цитогенетический анализ мейотических механизмов восстановления фертильности у пшенично-ржаных гибридов (ABDR,  $4x=28$ )», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность темы. Отдаленная гибридизация широко представлена среди всех семенных растений и является одним из основных механизмов видообразования. В настоящее время исследование этого процесса вышло на новый уровень в связи с возможностью оценки ее роли на основе данных молекулярной цитогенетики и секвенирования геномов. В результате межвидовой и межродовой гибридизации с последующим удвоением числа хромосом возникают аллополиплоиды. Главным механизмом полиплоидизации при этом является слияние нередуцированных гамет, которые возникают в процессе мейотической реституции. Исследование мейотической реституции началось еще в 20-х годах XX века, но весьма актуально и в настоящее время. Изучение этого явления имеет как теоретическое значение – для познания фундаментальных аспектов эволюции, так и практическое – в селекционных программах для восстановления фертильности растений после отдаленной гибридизации.

В литературе имеются данные по изучению механизмов реституции растений из класса двудольных, для которых характерен симультанный цитокинез. Для растений из класса однодольных, к которым принадлежит мягкая пшеница, эти данные единичны. Основным цитогенетическим механизмом образования нередуцированных гамет при возникновении *T. aestivum* считается нерасхождение хромосом в первом мейотическом делении, второе же завершается образованием диад (FDR, «нередукционное мейотическое деление клетки», реституция первого типа). Данный механизм контролируется взаимодействием генов родительских видов. У гибридов *T. turgidum* x *Ae. tauschii* описан другой цитогенетический механизм формирования нередуцированных гамет – эквационное расхождение хромосом в первом делении мейоза, при этом второго деления не происходит (SDM, «единственное мейотическое деление», реституция второго типа); его цитогенетический механизм не изучен и нет данных о генетической регуляции. Известен также неопределенный тип реституции.

Несмотря на проводимые ранее исследования реституции у мягкой пшеницы и ее гибридов, механизмы формирования нередуцированных гамет у амфигаплоидных растений еще неясны. Целью исследований Д.Б. Логиновой являлось изучение мейотических механизмов восстановления фертильности у гибридов  $F_1$  *Triticum aestivum* x *Secale cereale*, в геномах которых несколько хромосом пшеницы замещено гомеологами ржи, и анализ фертильности потомства у амфидиплоидов  $F_1$  и  $F_2$  поколений. Тема ее исследований безусловно актуальна. Пшеница является важнейшей сельскохозяйственной культурой,

поэтому работы по изучению ее генома и увеличению биоразнообразия ведутся во многих странах мира.

Научная новизна диссертации Д.Б. Логиновой заключается в том, что впервые проведено комплексное молекулярно-цитогенетическое исследование регуляции мейоза у амфигаплоидов *Triticum aestivum* x *Secale cereale*, в геномах которых хромосомы пшеницы 1A, 2D, 5D, 6A замещены гомеологами ржи. Используя методы флуоресцентной гибридизации *in situ* и иммуноокрашивания, автором диссертации доказано, что замещение 2R/2D влияет на прохождение редукционного типа деления, а замещение 1Rv/1A, 5R/5D, 6R/6A – на проявление четырех типов поведения хромосом в мейозе частично фертильных гибридов F<sub>1</sub>.

Теоретическое и практическое значение. В результате исследований Д.Б. Логиновой получены новые данные о контроле клеточного цикла, организации центромерного района, формировании веретена деления при мейозе, когезии сестринских хроматид. Получены фундаментальные общебиологические сведения о возможности реализации в мейозе полигаплоидных организмов программы, подобной митозу. Работа имеет также и практическое значение; ее результаты необходимы для разработки генетико-селекционных программ повышения продуктивности сельскохозяйственных культур. Использование пшенично-ржаных замещенных линий в гибридизации с рожью посевной позволяет частично восстанавливать фертильность гибридов F<sub>1</sub>. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе Новосибирского агроуниверситета и могут быть рекомендованы для курсов лекций и практических занятий другим университетам.

Диссертантом выносятся на защиту два основных положения, которые вытекают из материалов, полученных автором. Текст диссертации изложен на 153 страницах и состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, библиографического списка. Диссертация включает 11 таблиц и 29 рисунков.

Глава 1 «Обзор литературы» (с. 12-55) посвящена анализу литературных данных. В первой части рассматриваются материалы о типах полиплоидии у растений, ее преимуществах, реорганизации генома полиплоидов. Вторая часть главы посвящена обзору публикаций по особенностям генома мягкой пшеницы и ее гибридов, контролю спаривания хромосом, увеличению генетического разнообразия. Третья часть посвящена исследованиям мейотической реституции у растений (рассматриваются основные механизмы образования нередуцированных гамет, механизмы реституции при реконструкции генома пшеницы и ее гибридов).

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – аллогексаплоид ( $2n=6x=42$ , геном AABBDD); образовался в результате естественной гибридизации тетраплоидной пшеницы *T. turgidum* L. ( $2n=4x=28$ , геном AABB) и диплоидного эгилопса *Aegilops tauschii* Coss. ( $2n=2x=14$ , геном DD). Донором генома А считается диплоидная пшеница *T. urartu* Thumanjan ex Gandiljan ( $2n=2x=14$ , геном AA).

Донор генома ВВ остается до настоящего времени неопределенным. Геном мягкой пшеницы состоит из трех субгеномов – А, В, D и разделен на 7 групп.

Хочу отметить, что автором проанализирован очень большой объем литературы, главным образом иностранной, как по многим общебиологическим вопросам, так и применительно к своим объектам исследования. В обзоре затрагиваются многие интересные вопросы, касающиеся эволюции злаков. Хорошо цитируются публикации последних лет. В этой главе хорошо видна эрудиция Д.Б. Логиновой, ее знание литературы.

В главе 2 (с. 56-64) описаны объекты, материалы и методы исследований. В качестве объектов и материалов исследования использовалась рожь посевная *S. cereale*, сорт Онохойская с диплоидным числом хромосом ( $2n=14$ , RR), пшеница мягкая *T. aestivum*, сорт Саратовская 29 с гексаплоидным числом хромосом ( $2n=42$ , AABBDD) и несколько пшенично-ржаных гибридов с тетраплоидным числом хромосом ( $4x=28$ , ABDR). Растения выращивались на экспериментальном поле СГК ИЦиГ СО РАН и в условиях гидропонной теплицы.

Микроспороциты окрашивали ацетокармином. Формирование аппарата веретена деления в митозе и мейозе изучали с помощью иммуноокрашивания с антителами к  $\alpha$ -тубулину (связывается с  $\alpha$ -тубулином микротрубочек), и к гистону CENH3 (выявляет активный кинетохор). Организацию ДНК в области центромеры изучали с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с использованием специфичных для центромеры проб.

В главе 3 (с. 65-97) представлены результаты собственных исследований автора диссертации. В первом разделе этой главы приведены данные по изучению влияния пшенично-ржаного замещения хромосом на характер мейоза у гибридов. Обычно мейоз включает два последовательных деления, в результате которых образуются четыре гаплоидных ядра; в первом делении происходит сегрегация гомологичных хромосом, во втором – сестринских хроматид. Автором диссертации показано, что у амфигаплоидов мейоз характеризовался наличием унивалентов в связи с полигаплоидным состоянием генома, поэтому мейотическое деление у гибридов было аномальным.

Деление происходило асинхронно – в одном пыльнике были мейоциты на разных стадиях развития. В первом делении мейоза наблюдалось различное поведение унивалентных хромосом – эквационное и/или редуционное расхождение. Второе деление мейоза также характеризовалось асинхронностью и различным поведением хромосом, наличием одиночных хроматид в части мейоцитов. Деление заканчивалось образованием диад, тетрад, полиад. В качестве небольшого дополнения хочу отметить, что асинхронность мейотических делений характерна для многих растений и присуща не только гибридам.

Установлено, что в первом делении мейоза растений  $2R(2D)_1 \times R$  унивалентные хромосомы случайно распределялись между полюсами. Во втором делении сестринские хроматиды расходились к разным полюсам и затем формировались тетрады. Иногда наблюдались несбалансированные гаметы и

стерильная пыльца. У гибридов  $F_1$   $1Rv(1A) \times R$   $5R(5D) \times R$   $6R(6A) \times R$  выявлено четыре различных типа деления. Первый тип редукционный, такой же, как и у гибридов  $2R(2D) \times R$ . Второй тип – редукционно-эквационный, он характеризовался случайным распределением некоторых бивалентов, а все остальные выстраивались в эквационной плоскости и в AI разделялись на сестринские хроматиды. Третий тип был эквационный, а в четвертом унивалентные хромосомы распределялись в виде круга и первое деление блокировалось. Частота встречаемости разных типов деления у амфигаплоидов была различной. Во втором делении мейоза также наблюдалось несколько вариантов. Установлено, что замещение  $2R/2D$  детерминирует редукционный тип деления и образование тетрад в конце телофазы II, замещения  $1Rv/1A$  и  $6R/6A$  – эквационный, а замещение  $5R/5D$  приводит к высокой частоте образования «кольца» в MI.

Во втором разделе главы приведены результаты изучения поведения хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов. Использовались иммуноокрашивание с антителами к  $\alpha$ -тубулину и гибридизация *in situ* с центромероспецифичными зондами. Это один из наиболее интересных и малоизученных ранее аспектов работы. В разделе представлены данные по молекулярно-цитогенетическому анализу митоза и мейоза у родительских форм и изучению формирования в мейозе гибридов с четырьмя вышеперечисленными типами деления.

Показано, что формирование веретена деления в митозе у ржи и пшеницы происходит сходным образом. Родительские формы ржи, пшеницы и замещенные линии характеризовались идентичной динамикой микротрубочкового цитоскелета в мейозе. Подробно исследованы особенности формирования веретена деления в мейозе амфигаплоидов с четырьмя описанными типами – редукционным, редукционно-эквационным, эквационным и с блокированием первого деления мейоза. В третьем разделе главы представлены результаты изучения фертильности пшенично-ржаных гибридов в  $F_1$  и  $F_2$ .

Глава 4 (с. 98-119) посвящена обсуждению результатов исследований. В обсуждении рассматриваются вопросы генетической регуляции реституции у пшенично-ржаных гибридов, причины реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов, предположительный механизм митозоподобного деления, особенности формирования веретена у амфигаплоидов, формообразование и продуктивность гибридов второго поколения. Полученные Д.Б. Логиновой данные вместе с литературными позволили предположить, что реституция у амфигаплоидов контролируется не одним, а несколькими генами. Гены локализованы на разных хромосомах, но их активность в большой степени зависит от генотипа гибридов.

У пшенично-ржаных гибридов выявлено два механизма формирования нередуцированных гамет (реституции) в первом делении: эквационное разделение хромосом в MI и блокирование первого деления мейоза с образованием моно-

полярного веретена и последующим разделением сестринских хроматид во втором. При этом основным является эквационное расхождение хромосом в МI, т.к. частота появления мейоцитов с монополярным веретеном незначительна. Установлено, что эквационное деление, приводящее к реституции, сочетает характеристики митотического и мейотического делений. Организация ДНК в районе центромеры и кинетохора соответствуют митотическому делению, но хромосомы располагаются вдоль веретена деления, а не поперек. Разделение хромосом в АI происходит одновременно, что отличается и от мейотической, и от митотической программ деления.

Завершают диссертационную работу заключение и выводы (с. 120-123). В заключении подводятся итоги исследований, проведенных автором. Результаты показывают, что реституция может произойти двумя путями. Первый – при эквационном делении хромосом с последующим блокированием второго деления. Второй – в результате блокирования первого деления при образовании монополярного веретена и сегрегации хроматид во втором делении мейоза. Показано, что пшенично-ржаные гибриды с замещением хромосом являются хорошей моделью для изучения механизмов реституции и мейотического деления в целом. Выводы обоснованы большим фактическим материалом и сомнений не вызывают.

Диссертация включает большой список литературы (с. 124-153), состоящий из 328 наименований, более 300 работ из них на иностранных языках, что свидетельствует о владении иностранными языками и хорошей эрудиции автора диссертации.

Общие замечания и мелкие недочеты работы. Автор постоянно по ходу всей работы пишет латинские названия своих объектов с авторами (например, *Triticum aestivum* L., или *T. aestivum* L.). Согласно современным ботаническим правилам, полное название с автором, описавшем вид, пишется только при первом упоминании, а потом дается родовое название сокращенно и без автора. А все остальные виды, на которые ссылается диссертант по литературным данным, приводятся везде без авторов. Используется неправильное с биологической точки зрения выражение – область естественного ареала произрастания (с. 22). Ареал – это и есть область произрастания или распространения.

Ссылки на литературу во всей диссертации даются без инициалов; принято в тексте писать с инициалами, а в скобках – без инициалов. Так более правильно, тем более, что упоминаются такие классики, как Н.В. Цицин и Г.Д. Карпеченко. В списке литературы практически на каждой странице нарушена хронология: более поздние работы цитируются раньше, чем более ранние. Сделанные замечания являются частными и ни в коей мере не умаляют достоинств очень большой работы, сделанной Д.Б. Логиновой, и не влияют на ее высокую оценку.

Материалы диссертации Д.Б. Логиновой прошли апробацию на многих совещаниях и конференциях различного ранга, среди которых много международных. Основные результаты диссертации отражены в имеющихся публикациях.

По теме диссертации опубликовано 10 работ, в том числе пять статей в журналах из перечня ВАК РФ («Генетика», «Вавиловский журнал генетики и селекции», «Plant Reproduction»). Автореферат отражает основное содержание диссертации.

В целом представленная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Все научные положения, выводы и рекомендации обоснованы. Достоверность результатов подтверждается большим объемом экспериментального материала, приводятся много документальных микрофотографий. Следует отметить тщательность и скрупулезность исследований, выполненных диссертантом. Результаты обладают научной новизной, т.к. молекулярно-цитогенетическое исследование регуляции мейоза у пшенично-ржаных гибридов выполнено впервые. Научное и практическое значение работы несомненно. Диссертация хорошо оформлена с использованием современных технических возможностей, иллюстрирована прекрасными цветными микрофотографиями.

На основании всего вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Логиновой Дины Борисовны «Молекулярно-цитогенетический анализ мейотических механизмов восстановления фертильности у пшенично-ржаных гибридов (ABDR,  $4x=28$ )» выполнена на актуальную тему, обладает научной новизной, практической ценностью, является самостоятельной и законченной научно-исследовательской работой. Работа полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Д.Б. Логинова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв подготовила: Муратова Елена Николаевна  
доктор биологических наук по специальности 03.02.01 – ботаника,  
профессор, зав. лабораторией лесной генетики и селекции  
Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии  
наук – ФИЦ КНЦ СО РАН  
660036, Красноярск-36, Академгородок, 50, строение 28,  
Тел. (391)2494184, E-mail: elena-muratova@ksc.krasn.ru  
<http://www.forest.akadem.ru>

*Муратова Е.Н.*

Е.Н. Муратова

12.09.2016

