

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе  
Санкт-Петербургского  
государственного университета

С.В. Аглонов



### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Диссертация Д.Б. Логиновой посвящена фундаментальным проблемам генного контроля, регуляции мейоза и восстановления фертильности у гибридов между мягкой пшеницей *Triticum aestivum* L. и рожью посевной *Secale cereale* L. Отдаленная гибридизация широко представлена среди цветковых растений и, по мнению автора диссертации, является основным эволюционным механизмом видообразования. Решающее значение для преодоления стерильности, возникающей при отдаленной гибридизации, и образования плодовых межвидовых и межродовых гибридов является удвоение числа родительских хромосом, что впервые в мире было установлено Георгием Дмитриевичем Карпеченко (Карпеченко, 1927). Основой такого удвоения является слияние нередуцированных, диплоидных гамет, которые возникают в результате мейотической реституции. Всесторонне рассматривая имеющиеся в литературе сведения о механизмах образования гамет с диплоидным числом хромосом, автор приходит к выводу, что множество примеров мейотической реституции описано, в основном, для двудольных растений, отличающихся по типу деления клеток, цитокинезу, от однодольных, к которым относятся рожь и пшеница.

Д.Б. Логинова совершенно справедливо отмечает, что изучение механизмов мейотической реституции важно для понимания не только фундаментальных аспектов эволюции, но и основ восстановления частичной фертильности после отдаленной гибридизации, используемой для получения новых ценных сортов сельскохозяйственных растений. Исходя из этого, цели и задачи представленной к защите диссертации являются исключительно актуальными.

Успешное проведение комплексных молекулярно-цитогенетических исследований регуляции мейоза у амфигаплоидов *T. aestivum* L. x *S. cereale* L., в геномах которых хромосомы пшеницы 1A, 2D, 5D и 6A замещены гомеологами ржи, несомненно, является большим достижением автора.

Диссертация Д.Б. Логиновой состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 29 рисунков и 11 таблиц.

Во ВВЕДЕНИИ автор рассматривает актуальность и степень разработанности темы исследования, логично подводит к формулировке целей и задач. В этом вводном разделе Д.Б. Логинова также останавливается на научной новизне работы, теоретической и практической значимости исследования, на положениях, выносимых на защиту, личном вкладе автора, приводит сведения об апробации работы и числе публикаций. По теме диссертации было опубликовано 10 работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах из списка ВАК, одна из которых в престижном иностранном журнале «Plant Reproduction» (2015 *Impact Factor*; 2.468).

Глава 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ – посвящен полиплоидии как особенности геномов растений. Автор рассматривает типы полиплоидии, преимущества полиплоидии, вопросы связанные с реорганизацией геномов полиплоидов. В этом разделе Д.Б. Логинова приводит детальную характеристику мягкой пшеницы и ее межвидовых и межродовых гибридов, подробно анализирует особенности ее генома, связанные с полиплоидизацией, а также расширение ее генофонда. Раздел «1.2.2 Контроль спаривания хромосом: локус *Ph1*» написан достаточно лаконично. Автор отмечает, что в ранних работах существовали только две основные гипотезы относительно механизма действия *Ph1*: пресинаптическая и синаптическая (стр.28, начало второго абзаца), не обращая внимание на предсказанное в те же годы влияние нарушений организации хроматина, выявленные у мутантов *ph1b*, что, по мнению исследователей, влияло на переключение партнера спаривания хромосом с гомологичного на гомеологичный у этого мутанта. Эта третья гипотеза получила очень хорошее подтверждение в свете современных открытий, сделанных в результате детального секвенирования протяженного локуса *Ph1* у мягкой пшеницы. Ссылки на все основные публикации последних лет есть в представленной диссертации. Имеющиеся в литературе сведения освещены достаточно полно. Однако, цитирование осуществлено не всегда достаточно точно. Так, остается неясным, что собой представляют *5BL cdk* – подобные гены (стр. 27, последний абзац, 8 строка снизу) и какое они имеют отношение к локусу *Ph1*.

Подробно написан раздел 1.3, посвященный мейотической реституции растений, в котором Д.Б. Логинова приводит сведения об основных механизмах образования нередуцированных гамет, а также о механизмах реституции при реконструкции генома пшеницы и ее гибридов. Этот раздел обзора литературы затрагивает вопросы, которые имеют непосредственное отношение к поставленным автором цели и задачам. Д.Б. Логинова отмечает, что для изучаемых ею пшенично-чужеродных гибридов описано несколько механизмов реституции, однако до недавнего времени не существовало единого и четкого представления о ее механизмах. Использование линий пшеницы с различными замещениями её хромосом на гомеологичные хромосомы ржи 1R/1A, 2R/2D, 5R/5D и 6R/6A, а также современные методы иммуноцитохимии и флуоресцентной гибридизации ДНК-ДНК *in situ* (FISH), позволили диссертанту существенно продвинуться вперед в понимании того, как происходит реституция у изучаемых пшенично-ржаных амфигаплоидов.

Глава 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ – написана достаточно подробно и последовательно в отношении исследованных линий пшеницы и гибридов, а также использованных методик. Однако, в нем явно недостает отдельного, специального подраздела с описанием всех проб (зондов), использованных для FISH. Надо отметить, что больше информации, представленной в компактной форме, содержится в соответствующем разделе автореферата. Однако, ни в диссертации, ни в автореферате нет характеристик ДНК ржи и пшеницы, использованных соответственно в качестве пробы и конкурентной ДНК для геномной ДНК-ДНК гибридизации (GISH), которая была проведена, нашла свое отражение в иллюстрациях (например Рис.3.16, стр. 88), но упоминания о которой, в плане методики, в диссертации нет. Также явно не хватает сведений о белках, к которым были наработаны использованные в работе антитела.

Внутри подраздела 2.2.7. Иммуноокрашивание сказано (строки 17-18 сверху стр. 63): «...наносили первичные антитела к альфа-тубулину...». Указано, что наработаны антитела в мышцах, но нет информации о том, белок какого организма был использован в качестве антигена. В случае антител к альфа-тубулину проблема решаема, так как это промышленные моноклональные антитела и можно выяснить этот вопрос, посмотрев в каталог Sigma-Aldrich. Это невозможно сделать в случае антител к  $\alpha$ -Tubulin, так как ни в диссертации, ни в автореферате нет такой информации. В разделе 2.2.7 в конце первого абзаца, стр. 63, указано, что антитело генерировано в кролике и указан №39254. Значение этого номера, равно как откуда получены эти антитела, осталось неизвестным. Этой информации нет ни в разделах «материал и методы» как диссертации, так и автореферата, нет ее и в «Благодарностях». Отсутствие этих сведений затрудняет возможность воспроизвести результаты, полученные диссертантом, другими исследователями в других лабораториях, что было бы хорошим подтверждением достоверности этих результатов.

Обращает на себя внимание и тот факт, что приготовлению давленных препаратов митотических хромосом посвящен целый подраздел (2.2.5 на стр. 60), а тому, как были приготовлены препараты мейоцитов, отведено 5 строчек в начале раздела 2.2.7 Иммуноокрашивание. И это при том, что, во-первых, вся диссертация посвящена изучению мейоза, во-вторых, на препаратах мейотических хромосом, помимо иммуноцитохимического окрашивания проводили также и FISH, причем не обязательно в сочетании с GISH, как написано в разделе 2.2.6 (стр.61, также Рис. 3.9, стр.76).

Кроме, того не нашло своего отражения в диссертации то, каким образом «отбирали пыльники на необходимой стадии» (подраздел 2.2.7. Первая строка).

Глава 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ – состоит из трех подразделов и посвящена: анализу влияния пшенично-ржаного замещения хромосом на характер мейоза у гибридов; изучению поведения хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов; анализу фертильности пшенично-ржаных гибридов  $F_1$  и  $F_2$ .

Анализ влияния пшенично-ржаного замещения хромосом на характер мейоза у гибридов (подраздел 3.1.) проведен Д.Б. Логиновой на ацетокарминовых препаратах. Диссертант изучала расположение хромосом на стадиях первого и второго деления мейоза, а именно в метафазе (MI и MII), анафазе (AI и AII), телофазе (TI и TII) у гибридов  $F_1$  (амфигаплоидов), полученных в результате скрещивания пшенично-ржаных дисомно-замещенных линий ( $2n=42$ ) с рожью (RR). Автором был изучен мейоз у следующих гибридов  $1Rv(1A)xR$ ,  $2R(2D)_1xR$ ;  $5R(5D)xR$  и  $6R(6A)xR$  (геномная формула  $ABDR$ ,  $4x=28$ ). Разными методами было проанализировано от 77 до 1582 клеток на гибридную комбинацию. В качестве контроля были использованы: яровая рожь *S. cereale* L. сорт Онохойская (RR,  $2n=14$ ), и мягкая пшеница *T. aestivum* L. сорт Саратовская 29 (AABBDD,  $2n=42$ ). Анализ мейоза у родительских пшенично-ржаных дисомно замещенных линий ( $2n=42$ ) в данной работе не проводили, поскольку они были получены и охарактеризованы в лаборатории ранее (Щапова, Кравцова, 1990; Силкова и др., 2006, 2007).

Различные типы мейоцитов в первом и втором делении мейоза у амфигаплоидов по сравнению с MI у ржи дикого типа представлены на Рис. 3.1. Фотографии напечатаны в довольно мелком масштабе и, с сожалением приходится признать, что не все они удачны. Сожаление это вызывает особенно потому, что они призваны продемонстрировать в самом начале изложения результатов те аномалии расположения хромосом в веретене, в экваториальной (не «эквационной», как пишет неоднократно Дина Борисовна) плоскости, то есть те аномалии процессов расхождения хромосом, которые в дальнейших частях диссертации исследовательница будет детально изучать с помощью современных методов молекулярной цитогенетики. На рисунке (а) представлена MI у ржи. 7 бивалентов (7II), ориентированных в экваториальной плоскости не очевидны для читателя. AI и вовсе неузнаваема. Можно сравнить с другими фотографиями, приведенными в той же диссертации, но уже на стр. 76, Рис. 3.9б и 3.9в, на которых отчетливо видны 7II в MI и по



7 хромосом у каждого полюса в АI. Рис.3.1б не является иллюстрацией редукционного расхождения, читателю приходится интерпретировать эту картинку в соответствии со словесным описанием. Рисунок 3.1 «и» также можно интерпретировать двояко. Такие картины можно видеть и при изучении мейоза у злаков дикого типа, имеющих совершенно регулярные тетрады. Если тетрада повернулась к исследователю своим полюсом, то он видит четыре клетки внутри одной калозной оболочки, если же рассматривать тетраду с экватора, то при определенном ракурсе будет видно только две клетки, которые сами имеют удлиненную форму, а также характеризуются удлиненным ядром, что и видно на приведенном рисунке 3.1 «и». Следовало бы предпринять меры для большей доказательности этих важных документов: напечатать их в более крупном виде, например. Фотографии на Рис.3.2 уже более качественные и, тем не менее, Рис.3.2 «эквационное» тоже не убеждает, поскольку не видна калозная оболочка. А раз это так, то представленная на фотографии клетка вполне может быть половинкой (одной из двух клеток) микроспоры на стадии МII, что достаточно часто можно видеть при просмотре давленных ацетокарминовых препаратов. На этом фоне основными доказательствами обнаружения контрастных различий между двумя группами гибридов  $2R(2D)_1 \times R$  vs  $1Rv(1A) \times R$ ,  $5R(5D) \times R$ ,  $6R(6A) \times R$ , остаётся то, что: 1) редукционное и смешанное редукционно-эквационное расхождения ни с чем не спутаешь, частоты их у отдаленных гибридов в этих группах очень высоки и достоверно различаются. Диаграмма на Рис.3.2 - весьма убедительна.

На основании проведенного анализа Д.Б. Логинова делает заключение, что замещение  $2R/2D$  детерминирует редукционный тип деления, замещения  $1Rv/1A$ , и  $6R/6A$  определяют эквационный тип деления, в то время как замещение  $5R/5D$  может в некоторых случаях приводить к высокой частоте образования «кольца» в МI. Последнее, по-видимому, является случаем «блокирования первого деления», что, исходя из приведенных диаграмм, происходит с очень маленькой частотой и несколько противоречит высказыванию о высокой частоте встречаемости такого типа расхождения/нерасхождения хромосом, обусловленного замещением  $5R/5D$ .

Раздел 3.2. «Поведение хромосом с прямой визуализацией динамики микротрубочек, организации хромосом и их центромерных районов» содержит принципиальные для диссертации результаты иммуноцитохимического исследования образования веретена и расхождения хромосом у амфигаплоидов, путем выявления структурных белков веретена и кинетохоров. В той же главе приведены данные по выявлению участков центромерной ДНК на хромосомах. Впечатляют великолепные по качеству и красоте фотографии, полученные Д.Б. Логиновой в результате осуществления FISH с центромеро-специфичными зондами  $pAet6-09$  и  $pAwRc$ , комбинирования FISH и GISH, постановки экспериментов по иммуноцитохимической локализации  $\alpha$ -тубулина, белка микротрубочкового аппарата веретена, в сочетании с выявлением белка CENH3, связанного с кинетохорами, и фосфорилированного гистона H3Ser10, который позволил изучить организацию и изменения состояния хромосом в процессе расхождения к полюсам деления. Не может также не впечатлять объем проделанной работы.

Для правильного понимания процессов формирования аппарата деления и поведения хромосом у амфигаплоидов исследовательницей был проведен молекулярно-цитогенетический анализ митотического и мейотического делений у родительских форм – растений ржи и пшеницы. Гибридизация *in situ* с центромероспецифичными зондами  $pAet6-09$  и  $pAwRc$  позволила визуализировать организацию ДНК в области центромеры на каждом из этапов деления.

Д.Б. Логинова установила, что формирование веретена деления в митозе происходило сходным образом у растений ржи и пшеницы. Что подтвердили данные других исследователей. К сожалению, правда, ссылки на процитированную статью 2014 года, не оказалось в списке литературы.

Для систематизации полученных данных Д.Б. Логиновой были составлены очень содержательные таблицы, например табл.3.1 и 3.2-3.5, в которых собраны сравнительные характеристики клеточного деления в норме и в мейозе у пшенично-ржаных амфигаплоидов. Для каждого из типов деления (редукционное, редукционно+эквационное, эквационное, блокирование первого деления) в таблицах во втором и третьем столбцах кратко обозначено (-/+) к какому типу деления (митоз или мейоз) ближе та или иная характеристика. Эта масштабная работа проделана диссертантом впервые в мировой практике. Известны работы по иммуноцитохимии, GISH и FISH у лилейных, у ржи, пшеницы и у других видов, но не в мейозе у отдаленных гибридов  $F_1$  различающихся генетическим фоном.

Так Д.Б. Логиновой было выяснено, что редукционный тип мейоза у пшенично-ржаных амфигаплоидов протекает целиком по типу мейоза у родительских видов, а в случае мейоза смешанного типа (редукционного + эквационного) для отдельных хромосом были характерны особенности, свойственные митозу. По мнению диссертанта, это связано с организацией ДНК в области центромера в метафазе, а также с ориентацией кинетохоров, монополярной в мейозе и биполярной в митозе. На основании своих результатов, автор делает вывод об автономности редукционного и редукционно+эквационного делений, не являющихся промежуточными фазами первого деления. Исследовательница заключает, что эти два типа делений не являются механизмами мейотической реституции.

Глава 4 – ОБСУЖДЕНИЕ – посвящена семи проблемам. Во-первых, тому, как осуществляется генетическая регуляция реституции у пшенично-ржаных гибридов. В этом подразделе всесторонне и содержательно рассмотрены преимущества использования линий с замещением хромосом пшеницы на чужеродные гомеологичные. Д.Б. Логинова совершенно справедливо утверждает, что такой подход сузит поиск генов, участвующих в генетической регуляции реституции у гибридов, и ограничит его пределами отдельных хромосом. Во-вторых, исследовательница обсуждает причины реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов, в числе которых монополярное веретено и эквационное деление. в-третьих, автором проанализировано, что эквационное деление, приводящее к реституции, сочетает характеристики митотического и мейотического деления. Диссертант также обсуждает предположительный механизм деления, подобного митозу, у пшенично-ржаных гибридов. На основании полученных данных диссертант предлагает оригинальную схему реституции у пшенично-ржаных амфигаплоидов с эквационным типом деления (Рис. 4.1, стр.114.). Аспекты формирования монополярного веретена у амфигаплоидов, автор обсуждает, привлекая имеющиеся в литературе сведения о мутантах, известных у других растений. В том же ключе Д.Б. Логинова обосновывает значение гибридов  $2R(2D)1xR$  для изучения динамики МТ в мейозе и удобство использования их в качестве модели для такого рода исследований. Автор не обошел вниманием и вопросы формообразования и продуктивности гибридов  $F_2$ , зависимость этих аспектов от конкретных генотипов, от механизмов восстановления фертильности.

В разделе ЗАКЛЮЧЕНИЕ Д.Б. ЛОГИНОВА лаконично и четко сводит воедино полученные данные и результаты их обсуждения. Предварительные данные о том, что замещение  $2R/2D$  детерминирует редукционный тип деления был дополнен Диной Борисовной ценными сведениями, которые удалось получить в результате масштабного молекулярно-цитогенетического анализа. Ею было экспериментально показано, что именно замещение  $2R/2D$  определяет монополярную ориентацию центромерных районов унивалентных хромосом и сохранение когезии сестринских хроматид в первом делении. С другой стороны Д.Б. Логинова показала, что замещения хромосом  $1Rv/1A$ ,  $5R/5D$ ,  $6R/6A$  противоположны по оказываемому влиянию на тип микроспорогенеза у амфигаплоидов, по сравнению с замещением  $2R/2D$ . Исследовательнице удалось выявить специфические характеристики эквационного типа расхождения унивалентных хромосом, а именно:

одноэтапное исчезновение когезии в области плечей и центромерных районов, митотическую организацию центромерных районов, выражающуюся в натяжении ДНК в области первичной перетяжки, а также биполярную ориентацию сестринских кинетохоров. Однако, автор заключает, что эквационный тип расхождения не тождественен митозу и имеет определенные специфические особенности, такие как продольное расположение сестринских хромосом в веретене деления. В общем и целом он характеризуется расхождением сестринских хроматид в первом и единственном делении мейоза. Блокирование первого деления происходит при образовании монополярного веретена, сестринские хроматиды расходятся во втором делении. Д.Б. Логинова впервые для мировой литературы надежно доказала, что эквационный тип деления и формирование монополярного веретена являются двумя мейотическими механизмами образования нередуцированных гамет у пшенично-ржаных амфигаплоидов. В Заключении диссертант также выявляет приоритетные направления будущих исследований.

На фоне частных замечаний необходимо отметить два главных достоинства диссертации: это, во-первых, высокий уровень эрудиции Д.Б. Логиновой в области отдаленной гибридизации и генетики мейоза, включая современную молекулярную генетику мейоза, и, во-вторых, высокий уровень цитологического и иммуно-цитохимического исследования мейоза у пшеницы, ржи и их гибридов, что доказывается многочисленными наборами первоклассных цветных микрофотографий ядер и хромосом мейотических клеток.

В целом диссертация Д.Б. Логиновой представляет собой высококлассное исследование в фундаментальной области генной регуляции процесса мейоза – ключевого генетического процесса наследственности. Впервые в отечественной научной литературе появилось крупное исследование, направленное на изучение вопросов мейотической реституции у отдаленных гибридов пшеницы и ржи, выполненное с применением методов молекулярной генетики и молекулярной цитогенетики. Особую значимость этому исследованию придает то, что в нем использована оригинальная коллекция дисомных замещенных линий пшеницы, которая имеет замечательную историю проводимых с ее помощью исследований. Результаты, обобщенные в диссертации, принесли не только искомые факты и выводы о механизмах мейоза и мейотической реституции у отдаленных гибридов пшеницы и ржи, но и положили начало новым направлениям работы в области молекулярной генетики отдаленных гибридов растений.

Несмотря на шероховатости, отмеченные в тексте этого отзыва, диссертация Д.Б. Логиновой выполнена на высоком научном уровне, который отвечает международным стандартам молекулярной генетики и клеточной биологии.

**ВЫВОДЫ**, сделанные в диссертации – обоснованы, сформулированы хорошо и масштабно. Они не только констатируют факты, но раскрывают логические связи действия генов, управляющих ходом мейоза у отдаленных гибридов.

Все материалы диссертации опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе в зарубежном журнале высокого уровня. Автореферат правильно отражает содержание диссертации.

Экспериментальные данные и теоретические положения, полученные в диссертации, могут быть включены в курсы лекций для студентов-биологов, специализирующихся в области генетики, цитогенетики, молекулярной и клеточной биологии, в университетах и других высших учебных заведениях биологического и сельско-хозяйственного профиля. Исследования в этой области, проводимые в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», следует продолжать и развивать.

Диссертация Д. Б. Логиновой соответствует пунктам 9-10 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к

кандидатским диссертациям согласно положению «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденному постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а её автор, Логинова Дина Борисовна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв составлен Е.И. Михайловой, доктором биологических наук, доцентом кафедры генетики и биотехнологии.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании кафедры генетики и биотехнологии 12 сентября 2016 года, протокол № 2.

Доцент  
кафедры генетики и биотехнологии  
Телефон: (812) 4284004,  
Электронная почта: e.i.mikhailova@spbu.ru

Е.И. Михайлова

И.о. зав. кафедрой генетики и биотехнологии,  
профессор  
Телефон: (812) 3210405,  
Электронная почта: g.zhuravleva@spbu.ru

Г.А. Журавлева

ЛИЧНУЮ ПОДПИСЬ  
*Е.И. Михайловой*  
ЗАВЕРЯЮ *и Г.А. Журавлевой*

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА  
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ СПбГУ  
Н. К. КОРЕЛЬСКАЯ



Сведения о ведущей организации:  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»  
Россия, 199034, Санкт-Петербург  
Университетская наб., д. 7-9  
Тел. +7(812) 3282000  
Эл. почта: [spbu@spbu.ru](mailto:spbu@spbu.ru)  
Сайт: [spbu.ru](http://spbu.ru)