

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Александра Феликсовича Мутерко

«АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *VRN* И *PPD* У ТЕТРАПЛОИДНЫХ И ГЕКСАПЛОИДНЫХ ВИДОВ РОДА *TRITICUM* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность исследования. Падение темпов роста урожайности таких важнейших зерновых культур как пшеница, рис и кукуруза является одной из главных причин мирового продовольственного кризиса последнего десятилетия. В свете возникшей проблемы, задача повышения урожайности этих культур, в том числе с использованием биотехнологических подходов, имеет первостепенное значение. Для движения в этом направлении необходимо тщательные исследования структурно-функциональной организации генов, прямым или косвенным образом регулирующие агрономически важные признаки растений. Работа А.Ф. Мутерко направлена на изучение изменчивости генов *VRN* и *PPD*, регулирующих потребность в яровизации и чувствительность к фотопериоду у пшеницы, зерновой культуры наиболее распространенной в мире. Оба процесса определяют адаптивные свойства пшеницы, продолжительность вегетативного периода, а также запускают цветение. Кроме того, гены серии *VRN* обладают плейотропным эффектом и влияют на широкий спектр признаков от урожайности до устойчивости к различным стрессовым воздействиям внешней среды. Фундаментальное значение работы связано с важностью изучения механизмов регуляции генов у полиплоидных растений в природе, особенно у аллополиплоидов, у которых множество гомеологичных генов вступают в специфические взаимодействия, реализуемые в виде новых адаптивных признаков и, вероятно, играют большую роль в эволюции высших растений. В связи с этим работа А.Ф. Мутерко представляет собой актуальное исследование, проливающее свет на генетику полиплоидных организмов и генетическую детерминацию физиологических процессов пшеницы, важных для сельского хозяйства.

Научная новизна. Данные о структуре, регуляции и аллельном разнообразии генов *PPD1* и серии генов *VRN* у для большинства видов полиплоидной пшеницы из различных эко-географических областей получены А.Ф. Мутерко в данном диссертационном исследовании впервые. Автором диссертации открыто несколько новых аллелей изучаемых генов, а также разработан подход генотипирования образцов на основе различий в кривизне ПЦР-продуктов, позволяющий избежать такие дорогостоящие подходы как секвенирование ДНК.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования.

Обнаруженные А.Ф. Мутерко аллельные варианты генов *PPD1* и серии генов *VRN*, и их сочетания могут быть использованы для селекции пшеницы с целью выведения новых сортов. Кроме того, результаты работы помогут разработать стратегию внедрения некоторых аллельных форм *Triticum durum* в конкретных эко-географических районах. Впервые разработанные ДНК-маркеры представляют собой быстрый и надежный способ идентификации аллелей и их сочетаний, которые можно будет использовать как в практической селекции, так и для дальнейшего исследования генетики пшеницы.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа А.Ф. Мутерко изложена на 249 страницах. Она содержит 28 рисунков, 7 таблиц и 15 приложений. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников.

Во введении автор описывает актуальность и новизну диссертационного исследования, теоретическую и практическую значимость результатов, формулирует цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, приводит описание своего вклада в работу, апробации результатов исследования, структуры диссертации, а также выражает благодарности. Вводные в содержание диссертации разделы написаны хорошо.

Глава «Обзор литературы» состоит из двух больших частей, посвященных описанию генетического контроля соответственно чувствительности пшеницы к фотопериоду и детерминации потребности пшеницы в яровизации. В первой части подробно приводится имеющаяся в литературе информация об аллельных вариантах генов *PPD-A1*, *PPD-B1* и *PPD-D1*. Во второй части описываются структурные особенности, полиморфизм, регуляция экспрессии (в том числе и эпигенетическая) генов *VRN1*; структура генов *VRN2* и продуктов их экспрессии; аллельные варианты гена *VRN3*; проводится описание гена *VRN4*; эпистатическое взаимодействие между генами *VRN* и регуляция процесса яровизации. В обзоре литературы приведена актуальная информация об изучаемых в диссертации генах, автор ссылается на современные и, в основном зарубежные, источники. Информационное содержание литературного обзора хорошо демонстрирует различия в полноте исследования генов *VRN* и *PPD*, что дает хорошее представление о состоянии данной области и пробелах в знаниях, которые необходимо заполнить.

В главе «Материалы и методы» приводится описание методов анализа, использованные в работе. Методы соответствуют современному уровню и описаны достаточно подробно. В работе А.Ф. Мутерко в основном использовал традиционные

методы молекулярной генетики, такие как ПЦР и электрофорез ДНК в агарозном и полиакриламидном гелях, секвенирование ДНК, применив необычный метод анализа кривизны молекулы ДНК, который объясняет обнаруженные в работе различия в подвижности ПЦР-продуктов. Используемый в работе подход по анализу кривизны ДНК позволяет значительно сократить финансовые затраты и время на проведение масштабного скрининга образцов пшеницы, заменив им в какой-то степени метод секвенирования. Различия в подвижности молекул в зависимости от их пространственной структуры, продемонстрированные в работе, показывают насколько важно учитывать особенности первичной последовательности исследуемых участков генома, прежде чем использовать сравнительный анализ длин фрагментов, полученных в ПЦР.

Глава «Результаты и обсуждение» начинается с анализа полиморфизма генов *PPD-A1* и *PPD-B1*. А.Ф. Мутерко приводит интересные данные о географическом распространении гаплотипа *Ppd-A1b*, а также дополняет существующие представления о структуре и эволюции гаплотипов гена *PPD-A1*. Автор демонстрирует, что в тетраплоидной пшенице преобладает гаплогруппа AI, а после возникновения аллогексаплоидов распространение получила гаплогруппа AII. Таким образом, было убедительно показано, что AI является эволюционно более древней гаплогруппой, тогда как ранее считалось наоборот. Данные, полученные в настоящем исследовании, хорошо согласуются с эволюцией и географическим распространением видов пшеницы. В ходе исследования также был обнаружен новый аллель гена *PPD-A1*, который может быть использован для селекции раннеспелых сортов, и определены основные гаплотипы генов *PPD-B1*, связанные с чувствительностью к фотопериоду.

Большая часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена изучению генов *VRN*. А.Ф. Мутерко были обнаружены нуль-аллельные варианты генов *ZCCT1* (*VRN2*) у нескольких видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы. Интересно, что у тетраплоидных видов не обнаружено, распространенных у гексаплоидных видов, нуль-мутаций по гену *ZCCT-A1*, но встречаются мутации по *ZCCT-B1*. Автором показано, что доминантный аллель гена *VRN3-B3* скорее всего встречается только в некоторых сортах мягкой пшеницы, но не у других видов.

Исследование генов *VRN1* позволило соискателю выявить новые аллели и новые варианты аллелей *VRN-A1* и *VRN-B1*, которые образуются в результате инсерций МГЭ и повторенных последовательностей, делеций и однонуклеотидных замен, том числе в поли-А трактах. Показано, что эти мутации ассоциированы со временем яровизации и сроками колошения. Впервые обнаруженный аллель *VRN-D1s* образован мутацией

интрона и ассоциирован со снижением чувствительности к яровизации. Исследование полиморфизма экзона-4 гена *VRN-A1* показал, что он характерен только для гексаплоидной пшеницы и ассоциирован с мутантным типом экзона-7.

Отдельно автором работы описывается исследование аллельного разнообразия генов *VRN* в сортах твердой пшеницы *T. durum*. Показано, что доминантный аллель *Vrn-B1c* чрезвычайно распространен в России, Украине и Казахстане, но не в других странах. Автором также сделана попытка обобщения полученных результатов, а именно связи комбинаций аллелей генов *VRN* в сортах *T. durum* с географическим положением центров культивирования. Три комбинации аллелей оказались специфичными для сортов Украины. Эти результаты важны для дальнейших исследований адаптации твердых сортов пшеницы к специфическим условиям произрастания, тем более данных по твердым сортам в настоящее время недостаточно.

Заключение по научным результатам, полученным в диссертации А.Ф. Мутерко вынесено в отдельную главу. В этой главе описываются основные научные результаты и дается их сжатая оценка, что несомненно является плюсом работы.

Глава «Выводы» содержит шесть выводов. Выводы 1-5 сформулированы четко и полностью соответствуют поставленным задачам. Вывод 6 является неконкретным и требует пояснений.

Значительную часть диссертации составляют приложения, в которых представлена информация справочного типа, либо подробное описание методов математического анализа, которые несомненно перегрузили бы основной текст работы.

Список литературы содержит 220 публикаций, что говорит о большой работе по анализу информации в исследуемой области, проделанной автором. Удивительно, однако, что в тексте встречаются только пять ссылок на русскоязычные публикации и все в первом авторстве самого диссертанта.

Основные результаты исследования А.Ф. Мутерко опубликованы в 10 научных изданиях, шесть из которых в журналах, рекомендованных ВАК, а также были представлены на международных конференциях, в том числе одной зарубежной.

В целом работа А.Ф. Мутерко производит хорошее впечатление, объем работы проделанной автором, внушает уважение. Выводы и основные научные положения, выносимые на защиту, полностью обоснованы. Диссертационная работа хорошо проиллюстрирована, изложена доступным языком, хотя и не без недочетов и опечаток. По результатам ознакомления с диссертацией необходимо сделать несколько **замечаний**:

1. В формулировке цели и задачи 5 на мой взгляд есть небольшое несоответствие. Так, цель работы сформулирована, как только «исследовать полиморфизм регуляторных районов генов ...», а задача 5 формулируется как «провести анализ полиморфизма транскрибируемого участка экзон-3 – экзон-7...». Возможно, было бы лучше сформулировать цель более широко, тем более что название диссертации более емкое, чем цель и охватывает полный перечень задач.

2. Еще одно замечание касается формулировки задачи 2. Автор предлагает исследовать полиморфизм регуляторных районов генов у «ранее не изученных видов тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы», что вынуждает читателя обращаться к другим главам диссертации или литературе для поиска неизученных в период работы исследователя видов. Задачи необходимо формулировать максимально конкретно и перечислять какие именно объекты должны были быть изучены.

3. Недостатком обзора литературы на мой взгляд является отсутствие в концентрированном виде общей информации об объекте исследования, об организации его генома и других данных, которые облегчили бы восприятие последующих глав. К примеру, было бы полезно вынести в отдельную главу информацию о видах, сортах пшеницы, географии их происхождения и культивирования, геномной формуле, филогенетических отношениях и тому подобное. Нельзя сказать, что этих данных нет в диссертации вообще – многие из них косвенно упоминаются в разных главах, однако мне так и не удалось найти в работе информацию о том, какие виды пшеницы являются диплоидными, тетраплоидными и гексаплоидными. Все это создает трудности с оценкой масштаба проведенного исследования, в той части диссертации, где автор приводит использованный в исследовании генетический материал.

4. Число ссылок на работы по изучению генов *VRN* и *PPD*, проводимые российскими научными группами (в том числе и в родном для соискателя институте) несопоставимо мало по сравнению с числом имеющихся в доступе опубликованных источников.

5. Вывод 6 отличается от первых пяти выводов размытостью формулировки. Автору работы следовало бы уточнить какие именно виды (либо какие аллели, гаплотипы) пшеницы перспективны для селекции.

Указанные выше недочеты ни в коем случае не снижают ценность результатов диссертационной работы. В ходе ознакомления с диссертацией кроме высказанных замечаний у меня возникли два **вопроса** дискуссионного характера:

1. В диссертационной работе были обнаружены аллели, характеризующиеся заменами нуклеотидов или протяженностью поли-А трактов в регуляторных и кодирующих областях генов и различной степенью кривизны молекулы ДНК. Как вы считаете, сохраняется ли эта кривизна молекулы в живых клетках? И если так, то может ли она модулировать нуклеосомную укладку, взаимодействие с транскрипционными факторами, другими белками хроматина и, следовательно, сама по себе вносить изменение в регуляцию экспрессии генов?

2. Возможно ли что ассоциация полиморфных вариантов генов с чувствительностью к фотопериоду и с изменением потребности в яровизации связаны не столько с изменением первичной структуры регуляторных областей, сколько с эпигенетическими факторами, например, метилированием ДНК?

Заключение. Диссертационная работа А.Ф. Мутерко «Анализ полиморфизма генов *VRN* и *PPD* у тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum* L.», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, является законченным научным исследованием. Диссертационная работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Александр Феликсович Мутерко заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент

Артемов Глеб Николаевич

кандидат биологических наук,

доцент кафедры цитологии и генетики

Федерального государственного автономного

образовательного учреждения высшего

образования «Национальный исследовательский

Томский государственный университет».

Адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 36

Тел. 8(923)4179491

e-mail: glebartemov@mail.tsu.ru

Подпись Артемова Г.Н. заверяю

Ученый секретарь ТГУ



Н.А. Сазонтова

19.01.2018