

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01

НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Дата защиты 14 февраля 2018 г. протокол № 5

О присуждении **Мутерко Александру Феликсовичу**

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Анализ полиморфизма генов *VRN* и *PPD* у тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum* L.» по специальности 03.02.07 – генетика принята к защите 09.11.2017, протокол № 38, диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утвержден ВАК 15.01.2010 г., приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Мутерко Александр Феликсович, 1987 года рождения. В 2011 году окончил Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, г. Одесса, Украина. С 2011 по 2014 гг. проходил обучение в аспирантуре Одесского селекционно-генетического института – национального центра семеноведения и сортоизучения НААН Украины.

Приказом № 417 от 23.12.2015 г. Мутерко А.Ф. был прикреплен к ИЦиГ СО РАН для подготовки диссертации. Приказом № 190 от 20.05.2016 г. Мутерко А.Ф.

был зачислен в аспирантуру ИЦиГ СО РАН в качестве экстерна для сдачи кандидатских экзаменов на срок с 20.05.2016 – 20.11.2016 г.г.

В настоящее время Мутерко А.Ф. работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научный руководитель: **Салина Елена Артемовна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики и цитогенетики растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Кочиева Елена Зауровна** – доктор биологических наук, профессор, руководитель группы молекулярных методов анализа генома, ведущий научный сотрудник лаборатории системной биологии растений, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва.
2. **Артемов Глеб Николаевич** – кандидат биологических наук, доцент кафедры цитологии и генетики Томского государственного университета, г. Томск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, г. Москва. В своем положительном заключении, подписанном главным научным сотрудником, заведующим лабораторией ДНК маркеров растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, д.б.н., профессором Хавкиным Э.Е. и ведущим научным сотрудником, заведующим лабораторией диагностики патогенов растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии к.б.н. Дивашуком М.Г., и утвержденном ВРИО директора ФГБУН Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, член-корр. РАН, профессором, д.б.н. Карловым Г.И., указано, что «Научная новизна полученных лично соискателем результатов и сформулированных выводов состоит в том, что у шести видов тетраплоидной и шести видов гексаплоидной пшеницы идентифицировано 14 новых полиморфных вариантов генов *VRN-A1*, *VRN-B1*, *VRN-D1* и *PPD-A1*. ... Диссертационная работа Мутерко Александра Феликсовича на тему "Анализ полиморфизма генов *VRN* и *PPD* у тетраплоидных и гексаплоидных видов рода *Triticum* L." соответствует основным квалификационным требованиям "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г., №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Мутерко А.Ф. заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика. Отзыв обсужден и одобрен на заседании межлабораторного научного семинара ФГБУН "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии" 25.01.2018, протокол №1».

Соискатель имеет 25 опубликованных работ, из них по теме диссертации 18, общим объемом 178 страниц, в том числе 10 статей, (6 из них входят в международные базы Scopus, WoS) и 8 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций,

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. **Мутерко А.Ф.**, Салина Е.А. Анализ полиморфизма экзона-4 гена *VERNALIZATION-A1* у видов полиплоидной пшеницы. // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2017. - Том. 21. - №3. - С. 323-333. (IF 0.448, Scopus)
2. **Muterko A.**, Kalendar R., Salina E. Novel alleles of the *VERNALIZATION1* genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. // BMC Plant Biology. - 2016. - V. 16. - Suppl 1:9. (IF 3.631, Scopus)
3. **Muterko A.**, Kalendar R., Cockram J., Balashova I. Discovery, evaluation and distribution of haplotypes and new alleles of *Photoperiod-A1* gene in wheat. // Plant Molecular Biology. - 2015. - V. 88. - № 1-2. – P. 149-164. (IF 4.07, Scopus)
4. **Muterko A.**, Balashova I., Cockram J., Kalendar R., Sivolap Y. The new wheat vernalization response allele *Vrn-D1s* is caused by DNA transposon insertion in the first intron. // Plant Mol Biol Rep. - 2015. - V. 33. - № 2. - P.294-303. (IF 5.32, Scopus)

На диссертацию и автореферат поступило 9 отзывов, все положительные.

Отзывы прислали:

1. Беспалова Л.А. - д.с.-х.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, зав. отделом селекции и семеноводства пшеницы и тритикале ФГБНУ "НЦЗ им. П.П. Лукьяненко"; Филобок В.А. - к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ "НЦЗ им. П.П. Лукьяненко" (г. Краснодар).

2. Давоян Э.Р. - к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ "НЦЗ им. П.П. Лукьяненко" (г. Краснодар).
3. Ильницкая Е.Т. - к.б.н., зав. лабораторией селекции, сортоизучения и сохранения генофонда винограда ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия" (г. Краснодар). «В качестве замечания можно отметить, что в автореферате в разделе "Материалы и методы" не указано каким методом производили визуализацию ПЦР-продуктов в гелях после электрофоретического разделения».
4. Лоскутов И.Г. - д.б.н., доцент, главный научный сотрудник, зав. отделом генетических ресурсов овса, ржи, ячменя ВИР; Ковалева О.Н. - к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов овса, ржи, ячменя ВИР (г. Санкт-Петербург). «Из замечаний к автореферату можно отметить, что не совсем понятно какой материал был использован в данном исследовании (дикие популяции, местные или селекционные сорта) и откуда он был получен?».
5. Мироненко Н.В. - д.б.н., ведущий научный сотрудник лаб. иммунитета растений к болезням ФГБНУ ВИЗР (г. Пушкин, Санкт-Петербург).
6. Стёпочкин П.И. - д.с.-х.н., ведущий научный сотрудник СибНИИРС - филиал ИЦиГ СО РАН (п. Краснообск, Новосибирск).
7. Чесноков Ю.В. – д.б.н, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Агрофизический научно-исследовательский институт" (г. Санкт-Петербург).
8. Шаманин В.П. - д.с.-х.н., профессор кафедры агрономии, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО "Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина"; Потоцкая И.В. - к.с.-х.н., доцент кафедры агрономии, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО "Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина" (г. Омск).

9. Шрейдер Е.Р. - к.с.-х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории селекции пшеницы ФГБНУ "Челябинский научно-исследовательский институт сельского хозяйства" (п. Тимирязевский, Челябинск).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области молекулярной биологии и генетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих Институтов в нашей стране, проводящих исследования в области молекулярной биологии, генетики и биотехнологии растений.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований **разработаны** диагностические ДНК-маркеры для идентификации аллельных вариантов и гаплотипов генов *VRN1-4* и *PPD-1*, контролирующих у пшеницы потребность в яровизации и чувствительность к фотопериоду. Это позволило оценить их распространенность в различных видах полиплоидной пшеницы и выявить специфические аллельные комбинации в сортах твердой пшеницы из эколого-географических областей России, Казахстана и Украины, отличающие их от сортов *T. durum* из других центров культивирования.

Предложен новый, оригинальный метод оперативной идентификации полиморфных вариантов регуляторных районов генов *VRN-1* и *PPD-A1*, а также гаплотипов гена *VRN-A1* при скрининге больших коллекций генетического материала, основанный на анализе кривизны молекулы ДНК.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что изучен широкий спектр полиморфных вариантов регуляторных последовательностей генов *VRN-1*, *ZCCT-1 (VRN-2)*, *VRN-B3*, *VRN-D4*, *PPD-A1* и *PPD-B1* в двенадцати видах тетраплоидной и гексаплоидной пшеницы, четырнадцать из которых (13 для генов *VRN* и один для *PPD*) описаны впервые. **Доказано,** что однонуклеотидные мутации в последовательности VRN-бокса гена *VRN-A1*

оказывают влияние на потребность пшеницы в яровизации и сроки колошения. В ходе анализа полиморфизмов уточнены границы регуляторных районов в области промотора и первого интрона генов *VRN-1* и *PPD-1*.

Изучен полиморфизм транскрибируемого участка ДНК между третьим и седьмым экзонами гена *VRN-A1* и определены основные гаплотипы, характеризующие эту область в образцах полиплоидных пшениц. Показано, что полиморфизм четвертого экзона *VRN-A1* наблюдается исключительно в гексаплоидной пшенице и ассоциирован с мутантным типом седьмого экзона этого гена.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что выявлены перспективные образцы пшеницы, носители уникальных аллелей и гаплотипов генов *VRN* и *PPD-1* и их специфических комбинаций, которые могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так и в практической селекции.

В селекционной работе для оптимального подбора генетического материала могут быть использованы диагностические ДНК-маркеры, разработанные для быстрой идентификации аллельных вариантов генов *VRN-1*, *VRN-B3*, *VRN-D4*, *PPD-A1* и *PPD-B1* пшеницы методом ПЦР-анализа, а также выявленные специфические аллельные комбинации генов *VRN* в сортах *T. durum*, отражающие характерные эколого-географические особенности регионов России, Украины и Казахстана.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы стандартные методы и подходы молекулярной генетики, оптимизированные для решения конкретных задач: полимеразная цепная реакция (ПЦР) для молекулярно-генетического анализа регуляторных районов генов *VRN* и *PPD-1*; секвенирование по Сенгеру для изучения первичной структуры полиморфных участков и идентификации новых аллелей и гаплотипов *VRN* и *PPD-1*; гетеродуплексный анализ для определения гаплотипов *PPD-A1* у видов полиплоидной пшеницы; гель-электрофорез в полиакриламидных гелях для регистрации конформационного полиморфизма фрагментов ДНК.

Стандартные биоинформационные методы анализа баз данных нуклеотидных последовательностей, *in silico* ПЦР, кластерный и филогенетический анализ, а также методы компьютерного моделирования пространственной структуры ДНК использовались в модификациях с применением оригинальных авторских разработок и алгоритмов.

Применение выше описанных методов позволило провести масштабное исследование генов *VRN* и *PPD-1* пшеницы – от первичной структуры ДНК до их фенотипического проявления на уровне организма.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что в работе использованы современные экспериментальные методы, адекватные поставленным задачам. Подбор генетического материала для анализа полиморфных вариантов генов *VRN* и *PPD-1* охватывает практически все многообразие видов полиплоидной пшеницы и представлен в объеме, достаточном для формулировки выводов с представленной степенью обобщения. В экспериментах присутствуют все необходимые контроли. Показана высокая воспроизводимость результатов, как по анализу альтернативных аллелей и гаплотипов генов *VRN* и *PPD-1* в образцах полиплоидных пшениц, так и по анализу конформационного полиморфизма в последовательностях ДНК этих генов. Предсказанная кривизна фрагментов ДНК, рассчитанная по трехмерным моделям с использованием оригинального алгоритма, хорошо согласуется с экспериментальными данными по анализу миграции этих фрагментов в полиакриламидном геле, что позволило разработать особого типа кодоминантные ДНК-маркеры для идентификации гаплотипов гена *VRN-A1*. Полученные данные дополняют и расширяют существующие представления о структуре регуляторных районов генов *VRN-1* и *PPD-1* и роли *VRN*-бокса в контроле экспрессии гена *VRN1*.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном выполнении всех лабораторных анализов и экспериментов, разработке оригинальных компьютерных алгоритмов для решения биоинформатических задач, личной

