

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Андрея Борисовича Щербаня «Эволюционные аспекты формирования аллополиплоидных геномов злаков», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Общеизвестно, что подавляющая часть видов высших растений имеют аллополиплоидный геном, возникший в результате объединения двух и более различных геномов в ядре и последующих процессов геномной реорганизации. Проводимые до последнего времени исследования процессов реорганизации геномов под действием аллоплоидизации были нацелены главным образом на исследование хромосомных и генных перестроек и последствий этих перестроек на уровне транскриптома. В то же время процессы геномной реорганизации, связанные с некодирующими повторяющимися последовательностями ДНК, генами «домашнего хозяйства» и специализированными генами, обеспечивающими расширение адаптивного потенциала аллополиплоидов, оставались малоизученными. В связи с этим **актуальность темы** диссертационной работы А.Б. Щербаня, посвященной исследованию особенностей реорганизации таких компонентов генома, как LTR ретротранспозоны, гены рРНК и гомеологичные гены *VRN-1*, в процессе образования и эволюции аллополиплоидных видов злаков, не вызывает сомнений.

Научная новизна представленной А.Б. Щербанем к защите диссертации состоит в том, что в ней впервые исследовано участие различных по своей структурно-функциональной организации областей геномной ДНК в процессе эволюционного преобразования аллополиплоидного генома злаков. Автором продемонстрировано сохранение специфической структурной организации отдельных семейств LTR-ретротранспозонов в составе субгеномов полиплоидных видов риса и мягкой пшеницы на протяжении прошедшего эволюционного периода. Установлено, что уже на ранних стадиях аллоплоидизации возможны делеции неактивной части генов рРНК в одном из родительских геномов. Получены данные в пользу представлений о неслучайности таких изменений, приводящих к формированию определенной эволюционно консервативной организации этих генов у аналогичных по геномному составу естественных аллополиплоидов. С применением почти-изогенных линий мягкой пшеницы, несущих аллели *VRN-B1* гена с различающейся структурой первого интрона, установлено влияние этого регуляторного района на транскрипцию *VRN-1* и сроки колошения. Установлено, что процесс аллополиплоидизации, сопровождаемый искусственным отбором яровых форм, привел к ускорению формирования и распространения новых доминантных аллелей локусов *VRN-1* и их комбинаций, оптимальных для конкретных климатических условий. В итоге это обеспечило широкое распространение полиплоидной пшеницы, включая тетраплоидные ее формы и гексаплоидную пшеницу *Triticum aestivum*. **Теоретическая значимость** работы определяется, в частности, тем,

что полученные научные результаты могут быть использованы как в исследованиях механизмов реорганизации аллополиплоидного генома с участием различного типа повторяющихся последовательностей ДНК, включая мобильные генетические элементы высокой копияности и гены рРНК, так и при изучении молекулярных механизмов взаимодействия гомеологичных генов в составе аллополиплоидного генома. Полученные результаты могут быть использованы и в исследованиях влияния генов *VRN-1* на формирование типа развития растения и детерминацию сроков колошения у аллополиплоидных форм злаков.

Работа А.Б. Щербаня имеет также большую **практическую ценность** для отбора форм пшеницы с заданными комбинациями аллелей генов *VRN-1* с помощью разработанного им комплекса аллель-специфичных ДНК-маркеров. Результаты работы с очевидностью могут найти применение как в селекционных программах, так и в образовательном процессе.

Характеристика диссертации. Работа Андрея Борисовича Щербаня представляет собой законченное исследование, отвечающее по оформлению всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям. Она изложена на 335 страницах печатного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты, их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы и приложение. Работа иллюстрирована 58 рисунками и 14 таблицами. Список цитированной литературы включает 593 источника.

Во введении, написанном по общепринятой форме, автор обосновывает актуальность выяснения молекулярно-генетических механизмов реорганизации аллополиплоидного генома злаковых растений, формулирует цель и задачи работы. В этом же разделе в кратком виде приводятся сведения, характеризующие диссертационную работу в целом.

В обзоре литературы, состоящем из четырех разделов, автором детально рассмотрены современные представления об аллополиплоидизации как основном факторе в эволюции высших растений, вопросы структурно-функциональной организации генома высших растений на молекулярном и хромосомном уровнях. Отдельный раздел посвящен анализу современного состояния исследований генетических и эпигенетических изменений у аллополиплоидов, включающих хромосомные перестройки и геномные изменения, обусловленные перемещением мобильных генетических элементов. В заключительном разделе подробно рассмотрены вопросы генетического контроля продолжительности вегетационного периода у диплоидных и полиплоидных видов высших растений. В заключительной части этой главы автор в кратком виде приводит обоснование актуальности проведения своего исследования.

Глава «**Материалы и методы**» содержит подробное описание использованного растительного материала, процедур и методов выделения ДНК растений и плазмид, ВАС-клонов, ПЦР и RAPD-анализа, блот-гибридизации по Саузерну и CAPS метода, анализа метилирования рДНК, анализа первичной структуры ДНК, выделения РНК, количественной ОТ-

ПЦР и анализа продуктов этой реакции. Уверенное владение совокупностью этих методов позволило автору успешно решать поставленные в работе научные задачи.

В третьей главе диссертационной работы приводятся **результаты собственных исследований**. Проведенное автором изучение дивергенции короткой последовательности ретротранспозона *gypsy* в геномах комплекса риса (*Oryza officinalis*) показало, что у аллотетрапоидных видов комплекса сохраняются видоспецифичные паттерны организации данного ретроэлемента, характерные для диплоидных предшественников. Важно отметить, что такая особенность эволюции LTR ретроэлементов была подтверждена при анализе отдельного семейства этих элементов, специфичного для D-субгенома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*). Важным этапом работы было проведение анализа ранних геномных изменений в составе искусственных амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops* с целью их сопоставления с геномными изменениями у природных аллополиплоидов. Для этого автор исследовал тандемные макро- и микросателлитные повторы, и кодирующие умеренно-повторяющиеся последовательности генов 45S и 5S рРНК. Установлено, что супрессия генов рРНК в одном из родительских субгеномов сопровождается элиминацией супрессированных генов в отдельных хромосомных локусах. Как удалось показать автору, обнаруженные изменения генов рРНК в составе синтетических амфиплоидов отражают аналогичные процессы, происходящие у сходных по геномному составу природных аллополиплоидов. На следующем этапе работы был проведен анализ гомеологичных локусов *VRN-1* у мягкой пшеницы. Обнаружен различный уровень экспрессии этих локусов в зависимости от структуры регуляторных районов. Впервые показана важная роль I-го интрона *VRN-1* в определении уровня транскрипции и срока колошения яровых форм этого вида. Итогом этого этапа исследования стала разработка системы молекулярных маркеров, позволяющая проводить скрининг гомеологичных локусов *VRN-1* в материале пшениц различного происхождения и уровня плоидности. С использованием этой системы автор установил, что формирование разнообразия аллелей этих локусов и их комбинаций, определяющих широкую адаптивную радиацию полиплоидных пшениц, происходило на полиплоидном уровне путем искусственного отбора *VRN-1*-гаплотипов, оптимальных для конкретных климатических зон. В целом, как следует из представленных результатов, автору удалось успешно решить стоящие перед ним задачи по выяснению особенностей реорганизации таких компонентов генома, как LTR ретротранспозоны, гены рРНК и гомеологичные гены *VRN-1*, в процессе образования и эволюции аллополиплоидных видов злаков.

Материалы автореферата и 23 опубликованных в журналах из Перечня ВАК РФ статей полностью отражают содержание диссертации. Работа А.Б. Щербаня прошла успешную апробацию на многочисленных всероссийских и международных конференциях.

Выводы диссертации, в целом, удачно отражают ее содержание. Степень обоснованности выводов, научных положений и рекомендаций не вызывает сомнений.

Вместе с тем при знакомстве с диссертационной работой возникли следующие замечания:

1. В разделе 3.1.1 главы «Результаты» автором делаются определенные заключения по межвидовым взаимоотношениям между диплоидными видами и тетраплоидами у *Oryza officinalis*. Следует заметить, что на основании одной последовательности невозможно делать такие выводы. По-видимому, можно рассматривать полученные данные с точки зрения дивергенции определенной последовательности и использования ее в качестве инструмента для выявления особенностей организации геномов полиплоидов относительно предполагаемых диплоидных предков.
2. Как следует из представленных на стр. 134 данных, дендрограмма комплекса *O. officinalis* (рис. 24) была получена в результате суммарного выравнивания всех последовательностей интегразного домена. Вероятно, имело бы смысл проанализировать отдельно специфичные для отдельных геномов последовательности, что позволит более детально проследить их эволюцию.
3. В разделе 3.3.1 главы «Результаты» обращает на себя внимание подробное описание результатов, не имеющих действительно научного значения и обусловленных, вероятнее всего, артефактами методов (неспецифическим отжигом праймеров и др.). Вероятно, эту часть можно без ущерба для научного содержания данного раздела значительно сократить по объему, сделав заключение о том, что использованные подходы не позволили выявить существенных изменений в исследуемой фракции геномной ДНК из данного конкретного объекта.
4. В главе «Материалы и методы» дается излишне подробное описание ставших рутинными молекулярно-биологических методов (например, выделение ДНК плазмид, RAPD-анализ, электрофорез ДНК, блот-гибридизация и др.), в чем на самом деле нет необходимости.
5. Поскольку фрагмент гибридизации на рис.34 (стр. 154), отмеченный стрелкой, достаточно слабый и вполне может быть неспецифическим, то вывод автора о появлении новых единиц у гибрида представляется недостаточно обоснованным.
6. Результаты по оценке уровня метилирования рестриктазами не могут рассматриваться как вполне доказательные. Для этого требуется проведение бисульфитного секвенирования. Приводимые здесь данные можно рассматривать как предварительные.
7. На рис. 37 очень сложно увидеть приводимую нумерацию хромосом.
8. В разделе 4.3.2 главы «Обсуждение» излишне детально описывается подбор эффективных маркеров. Этот раздел более уместен в разделе «Приложения».

В целом, сделанные замечания не снижают несомненной научной ценности проделанного А.Б. Щербанем исследования, которое по своей теме полностью соответствует специальности "генетика". С основными положениями, выносимыми на защиту, оппонент согласен.

Заключение

Диссертация Андрея Борисовича Щербаня «Эволюционные аспекты формирования аллополиплоидных геномов злаков», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук является законченной научно-исследовательской работой, в которой автором получен ряд приоритетных результатов по проблеме эволюционных механизмов реорганизации аллополиплоидного генома злаковых растений. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, методическому уровню работа соответствует п.9 "Положения о порядке присуждения учёных степеней", утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г., предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Заведующий лабораторией генетической
инженерии растений ФГБУН Сибирский
институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской
академии наук, д.б.н., проф.

/Константинов
Юрий Михайлович/

28.10.2017

Данные об авторе отзыва

Константинов Юрий Михайлович, доктор биологических наук, профессор,
заведующий лабораторией генетической инженерии растений СИФИБР СО
РАН

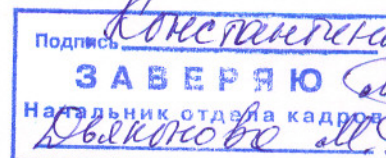
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317.

Тел.+7 (3952) 42-67-21

Факс +7 (3952) 51-07-54

Сайт: <http://sifibr.irk.ru>

E-mail: matmod@sifibr.irk.ru



28.10.2017