

Отзыв

на диссертацию Щербаня Андрея Борисовича

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ АЛЛОПОЛИПОИДНЫХ ГЕНОМОВ ЗЛАКОВ

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук

по специальности Генетика – 03.02.07.

Диссертация Андрея Борисовича Щербаня представляет собой завершенное научное исследование, подводящее итоги многолетних исследований автора в области геномного анализа полиплоидии у злаков.

Обзор литературы по теме исследования выполнен на очень хорошем уровне, написан внятным и доступным языком, отражает все основные направления исследований в изучаемой области знаний.

Глава Материалы и методы подробно описывает все лабораторные процедуры, использованные при проведении исследований.

В главе Результаты описаны проведенные эксперименты в строгом соответствии с заявленной целью работы - изучение реорганизации трех компонентов генома в процессе образования и эволюции аллополиплоидных форм злаков: 1) мобильных элементов класса LTR ретротранспозонов (разделы 3.1. и 3.2.); 2) tandemных повторяющихся последовательностей (ПП) ДНК, включая гены «домашнего хозяйства», кодирующие рРНК (раздел 3.3); 3) значимых для адаптации специализированных генов на примере гена VRN-1 (раздел 3.4).

В разделе 3.1. представлены результаты исследования последовательности *gypsy*- ретротранспозона в составе ди- и полиплоидных геномов комплекса *Oryza officinalis*. В ходе работ, с одной стороны, была клонирована и идентифицирована последовательность ДНК pOe 49, которая является частью интегрального домена Ty3-gypsy LTR ретротранспозона. Данный клон был использован в качестве зонда для блот-гибридизации с тотальной ДНК различных видов комплекса *O. officinalis*. По результатам проведенного RFLP анализа получена картина распространения этого ретротранспозона в геномах изучаемых видов риса, рассчитаны генетические расстояния, построена дендрограмма, отражающая степень сходства изучаемых геномов видов риса по распространению в них анализируемого Ty3-gypsy LTR ретротранспозона. С другой стороны, была изучена дивергенция структуры самого Ty3-gypsy LTR ретротранспозона в геномах видов риса, и уже на этой основе построена еще одна дендрограмма генетических расстояний этих видов. Почти полное

соответствие двух альтернативных дендрограм позволяет сделать вывод, что LTR ретротранспозон, некогда встроившись в геном хозяина, эволюционирует вместе с ним, причем, никакого отношения к полиплоидизации вида-хозяина изменения в структуре LTR ретротранспозона, видимо, не имеют. Отсюда следует вывод, что последовательности LTR-ретротранспозонов могут быть использованы в качестве маркеров отдельных видов рода *Oryza*, по которым можно проследить «родословную» полиплоидных видов этого рода.

В качестве замечания: картину блот-гибридизации (RFLP), отражающую схему локализации фрагмента LTR-ретротранспозона pOe 49 в геномах изучаемых видов риса, не следует называть «анализом структурной организации последовательности pOe 49 у различных образцов комплекса *O. officinalis*». Как раз структурная организация последовательности pOe 49 выявляется в результате секвенирования у 13 образцов INT-фрагментов, содержащих pOe 49.

В разделе 3.2. приводятся результаты анализа D-геном-специфичного ретроэлемента в составе генома мягкой пшеницы.

Идея заключалась в том, чтобы экспериментально установить тот факт, что спариванию гомеологичных хромосом в мейозе у аллотетраплоидов препятствует элиминация участков ДНК в одном из геномов. Ранее, в литературных источниках сообщалось, что у гибридов *Aegilops* и *Triticum* элиминация ДНК происходит уже на ранних стадиях формирования аллополиплоида в F₁, при этом данный процесс является стабильно воспроизводимым и может захватывать до 15% геномной ДНК (Ozkan et al., 2001; Shaked et al., 2001). Еще один существенный факт, установленный ранее, свидетельствует о том, что значительной редукции в первом поколении искусственных амфилоидов *Triticum-Aegilops* подвергаются именно субтеломерные последовательности, в частности, повторы последовательности *Spelt1*, занимающей 2% генома *Ae. speltoides* (Salina et al., 2006). Стремясь идентифицировать ВАС-клон в геноме *T.aestivum*, содержащий мобильные элементы, специфичные для отдельных субгеномов полиплоидной пшеницы, автор выявил клон ВАС_112D20, в составе которого присутствует повторяющейся мобильный элемент, получивший широкое распространение в D-геноме и, соответственно, позволяющий эффективно идентифицировать хромосомы D-генома у гексаплоидной пшеницы. Детальный анализ последовательности этого ВАС клона позволил установить, что D-геном-специфичность клона ВАС_112D20 обуславливает ретроэлемент *gypsy*-LTR-ретротранспозон *Lila_112D20-1*, который некогда подвергся амплификации внутри предкового вида *Ae. tauschii* - донора D-генома *T.aestivum*. Таким образом, также, как и при анализе полиплоидов рода *Oryza*, было установлено, что последовательности LTR-ретротранспозонов могут быть использованы в качестве маркеров отдельных предковых видов сложных полиплоидов у злаков.

В разделе 3.3. автор стремился проанализировать ранние геномные изменения, происходящие в ходе аллополиплоидизации с использованием модели синтетических амфиплоидов *Triticum* x *Aegilops*. Анализу подвергались различные последовательности геномной ДНК - субтеломерные, микросателлитные (SSR), случайно амплифицируемые последовательности ДНК (RAPD). Данные конкретные маркерные системы не позволили выявить существенной реорганизации геномной ДНК у синтетических амфиплоидов, однако анализ организации умеренно-повторяющихся последовательностей, кодирующих рибосомальную 45S и 5S рРНК выявил делеции генов 45S рРНК в составе отдельных хромосомных локусов у амфиплоидов *Ae. umbellulata* x *Ae. sharonensis*. Таким образом, было впервые показано, что уже на ранних стадиях аллополиплоидизации происходит конкурентное ингибирование экспрессии и элиминация умеренно-повторяющихся генов рРНК одного из родительских геномов.

В разделе 3.3.2.3. (Анализ метилирования 45S рДНК), автором предпринята попытка проанализировать эпигенетические изменения генов 45S рРНК у амфиплоида *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata*, для чего были использованы рестриктазы-изошизомеры *MspI* и *HpaII*, которые распознают в качестве «мишени» одну и ту же последовательность 5'-CCGG, однако различаются по своей чувствительности к метилированию этого сайта рестрикции. Суть эксперимента заключался в том, что ДНК амфиплоидов *Ae. sharonensis* x *Ae. umbellulata* и их родителей обрабатывали этой парой эндонуклеаз *Hpa II* и *Msp I*, затем проводили ПЦР, стремясь выявить различия в степени метилирования родительских последовательностей рибосомальных генов у амфиплоидов. По этому разделу у меня есть небольшое замечание.

На стр. 154. говорится:

«Для обнаружения полиморфизма сайтов метилирования внутри ETS мы вначале обрабатывали геномную ДНК HpaII и MspI, затем проводили ПЦР с праймерами PII и PIV, которые дают различающиеся ПЦР-продукты у родительских видов (Рис. 32). Район- мишень находится вблизи TIS и содержит 3 сайта HpaII/MspI. В случае рестрикции по этим сайтам ПЦР- продукт не должен амплифицировать. ПЦР с использованием необработанной геномной ДНК (контроль) продуцировала ярко-выраженные фрагменты от обоих родителей у всех исследованных амфиплоидных растений S2 и S3 (Рис. 35a). В отличие от этой картины, ДНК амфиплоидных растений, обработанная MspI, давала ПЦР-продукт от Ae. umbellulata, значительно более слабой интенсивности по сравнению с продуктом Ae. sharonensis (Рис. 35б). Сходная картина была получена в результате ПЦР-амплификации HpaII- обработанной

геномной ДНК (Рис. 35в). Эти результаты позволяют предположить относительно большую степень метилирования повторяющихся единиц 45S рДНК *Ae. sharonensis*, вероятно связанную с супрессией NOR этого генома в ходе аллополиплоидизации (с. 155).

В предложении В отличие от этой картины, ДНК, обработанная *MspI* давала ПЦР-продукт от *Ae. umbellulata*, значительно более слабой интенсивности по сравнению с продуктом *Ae. sharonensis* (Рис. 35б) вероятно имеется в виду, что ПЦР продукт значительно более слабой интенсивности появляется именно у амфиплоидных растений S2 и S3, потому, что если сравнивать ПЦР-продукты собственно от *Ae. umbellulata* и *Ae. sharonensis* после обработки *MspI* (*HpaII*) (как предлагает текст), то у них интенсивность совершенно одинаковая.

Совершенно особый интерес представляет раздел 3.4., посвященный структурно-функциональному анализу гомеологичных генов VRN-1 в геномах полиплоидных пшениц. Мутации в регуляторных районах гена VRN-1, а именно в промоторе и 1-м интроне ассоциируется со способностью растения переходить от озимого к яровому типу развития. Автором впервые был идентифицирован новый аллель VRN-B1c, для которого характерны существенные изменения в последовательности первого интрона - делеция 0.8 тпн и дупликация 0.4 тпн. Указанные изменения достоверно коррелируют с уровнем экспрессии этого гена, хотя механизм такой взаимосвязи на сегодняшний день остается неизвестным. Так или иначе, автор впервые продемонстрировал важную роль 1-го интрона VRN-1 в определении уровня транскрипции и срока колошения яровых форм мягкой пшеницы. Кроме того, автором предложена система специфических праймеров пригодных для идентификации всего разнообразия аллелей генов VRN-B1, что является незаменимым инструментом для быстрой и эффективной оценки аллельного полиморфизма этих генов в растительном материале различного происхождения. Ранее, для скрининга генофонда мягкой пшеницы на аллели гена VRN-B1 использовались праймеры, позволяющие дискриминировать доминантный VRN-B1a и рецессивный аллель *vrn-B1* и (Fu et al. 2005). При работе с коллекциями ВИР мы часто сталкивались с тем обстоятельством, что не удавалось получить амплификации ни с одним из предложенных праймеров. Как выяснилось по результатам работы автора, среди российского генофонда яровых пшениц новый аллель VRN-B1c встречается почти в 45% случаев, и, создание праймеров для его идентификации представляет особую ценность для маркер-вспомогательной селекции. С помощью этой системы маркеров аллелей гена VRN-B1 в ВИРе в 2012 году был проведен молекулярно-генетический анализ коллекции мягкой пшеницы и опубликован «Каталог районированных сортов мягкой пшеницы из коллекции ВИР с идентифицированными аллелями *Vrn*- и *Ppd*-генов».

При чтении и осмыслении диссертации затруднения вызывает тот момент, что результаты по каждому из этих направлений и их обсуждение разнесены по разным главам.

Поскольку работа серьезная и разноплановая, читателю нелегко вникать в специфику методик, мотивацию разнообразных экспериментов, обсуждение результатов, если все это разнесено по разным разделам. Глава «Материалы и Методы» - традиционно обособленная, и это оправданно. Однако, на мой взгляд, результаты и обсуждение отдельных обширных тем в докторской диссертации можно было объединить, во имя доступности материала к восприятию.

Пример:

Только на стр. 202 главы «Обсуждение» выясняется, что:

«Существует метод поиска маркеров генетических локусов, основанный на подборе праймеров, специфичных к сайтам встраивания МЭ, и последующем анализе растительного материала с помощью ПЦР (ISBP- маркеры) (Раух et al. 2006). Мы использовали этот подход для более точной хромосомной локализации ВАС-клона 112D20 и определения приблизительного времени инсерции ретротранспозона Lila 112D20-1. С использованием праймеров к районам J1 и J2, фланкирующим этот ретротранспозон, проведен ПЦР-анализ различных видов Triticeae (Рис. 27).»

До того на стр.139, было сказано:

Хромосомную локализацию ВАС_112D20 мы определяли с помощью ПЦР-анализа нулли- тетраомных и делеционных линий T. aestivum с использованием специфических праймеров к районам, фланкирующим сайты встраивания ретротранспозона Lila в составе ВАС_112D20 (районы J1 и J2 длиной 402 и 355 пн, соответственно, Рис. 26).

Оптимальным для восприятия был бы абзац, где в первом же месте упоминания о J1 и J2 было бы написано:

«Существует метод поиска маркеров генетических локусов, основанный на подборе праймеров, специфичных к сайтам встраивания МЭ, и последующем анализе растительного материала с помощью ПЦР (ISBP- маркеры) (Раух et al. 2006). Мы использовали этот подход для более точной хромосомной локализации ВАС-клона 112D20 и определения приблизительного времени инсерции ретротранспозона Lila 112D20-1. С этой целью были сконструированы специфические праймеры к районам J1 и J2 (см. Главу 2), фланкирующим сайты встраивания ретротранспозона Lila в составе ВАС_112D20 (районы J1 и J2 длиной 402 и 355 пн, соответственно, Рис. 26).

В заключении хочу отметить, что диссертационная работа по объему исследованного материала, экспериментальному уровню, новизне полученных результатов и их практической значимости соответствует требованиям ВАК, а ее автор, Андрей Борисович Щербань, несомненно, достоин присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07. – генетика.

Доктор биологических наук



Е.К.Потокина

И.О. зам директора ВИР,

Главный научный сотрудник лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов ВИР, д.б.н. Потокина Е.К.

e-mail: e.potokina@vir.nw.ru, тел. (812)-312-51-61

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, 190000, Большая Морская, 42, 44.



Шербань А.Б.