

Федеральное государственное учреждение
**«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

27.10.2017 № 12307-2171-724

На №

□

□
«УТВЕРЖДАЮ»
Директор
член-корреспондент РАН
В.О.Молов
19 октября 2017г.



ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертационную работу Щербаня Андрея
Борисовича, выполненную на тему «Эволюционные аспекты
формирования аллополиплоидных геномов злаков» и представленную на
соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
03.02.07 – «генетика»**

Актуальность темы диссертационной работы. Актуальность темы исследования обусловлена необходимостью выяснения механизмов реорганизации аллополиплоидных геномов у хозяйственно-ценных видов растений, к которым относятся злаковые растения, такие как пшеница, рис, кукуруза, овес и др. Эта группа возделываемых растений является наиболее значимой в хозяйственной деятельности человека, в первую очередь, как источник зерна- основного продукта его питания.

Благодаря созданию методов высокопроизводительного секвенирования, в настоящий момент проведена расшифровка геномов многих видов растений, в том числе и гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* (AABBDD). Однако требуются еще очень большие усилия для определения механизмов функционирования и формирования столь сложной генетической системы. Препятствием для этой цели является не только избыточность генома пшеницы, связанная с полиплоидией, но и высокая его насыщенность повторяющимися элементами. К последним относятся многочисленные семейства мобильных элементов класса LTR- ретротранспозонов, функциональное значение которых в процессах аллополиплоидизации до сих пор до

конца не выяснены. Другим важнейшим классом повторяющихся элементов являются тандемные повторы, кодирующие рибосомальную РНК. Несмотря на то, что давно известен такой феномен как «ядрышковое доминирование» одного из родительских субгеномов у аллополиплоидов, тем не менее, структурные и эпигенетические основы этого феномена до сих пор не ясны. Отдельной задачей является определение процесса внутригеномной дивергенции гомеологичных генов, относящихся к различным субгеномам, и она напрямую связана с вопросом расширения адаптационного потенциала у аллополиплоидов и их широким распространением, по сравнению с диплоидными видами.

Таким образом, проведенное Щербанем А.Б. исследование, посвященное изучению эволюционных аспектов формирования аллополиплоидных геномов злаков, решает ряд актуальных научных задач и имеет прикладное значение для селекции новых форм злаков, адаптированных к тем или иным условиям окружающей среды.

Научная новизна исследования

Диссертационная работа Щербаня А.Б. посвящена изучению различных по типу организации и функциональной роли последовательностей геномной ДНК в процессе преобразования аллополиплоидного генома злаков. Было впервые показано, что в составе субгеномов полиплоидных видов риса и мягкой пшеницы отдельные семейства LTR-ретротранспозонов в целом сохраняют специфическую структурную организацию, характерную для диплоидных видов-предшественников. Это может быть объяснено тем, что в аллополиплоидном геноме существуют барьеры, сдерживающие процесс распространения и обмена мобильными элементами между субгеномами. Впервые показано, что у синтетических аллополиплоидов, уже на ранних стадиях их формирования происходят количественные изменения генов рРНК в отдельных локусах одного из родительских геномов. При этом установлено, что эти изменения неслучайны и аналогичны изменениям, происходившим в процессе эволюции у естественных аллополиплоидов со сходным геномным составом. Впервые показана корреляция между подавлением экспрессии указанных генов в составе одного из субгеномов и их частичной элиминацией.

Соискателем впервые установлено значение первого интрона этого гена в регуляции уровня его транскрипции и определении срока колошения яровой пшеницы. Также впервые проведен систематический анализ аллельного состава гомеологов *VRN-*

I у полиплоидных пшениц и их диплоидных предков. Показано, что у полиплоидов формирование спектра аллелей *VRN-1* и их распространение происходило независимо от диплоидных форм. При этом в результате селекционного процесса произошло закрепление определенных *VRN-1*- гаплотипов, обеспечивающих оптимальный для той или иной климатической зоны срок колошения и урожайность.

Теоретическое и практическое значение результатов исследования. В результате проведенного исследования были определены механизмы эволюционных изменений генома у аллополиплоидных видов, включающие различные типы геномных последовательностей (мобильные элементы, гены рибосомальных РНК). Были выявлены особенности взаимодействия генов в составе аллоплоидного генома. Показана структурно-функциональная дивергенция генов *Vrn-1* в процессе эволюции аллополиплоидов видов пшеницы и независимое от диплоидных предшественников возникновение аллельных вариантов *Vrn-1*, сцепленных с яровыми формами у тетраплоидных и гексаплоидных видов пшениц.

Помимо теоретического, полученные результаты имеют большую практическую значимость для селекционных программ, связанную с разработкой системы аллель-специфичных маркеров генов *Vrn-1*, позволяющую проводить направленный отбор форм с заданными аллельными комбинациями, что может значительно ускорить получение новых сортов и линий твердой и мягкой пшеницы.

Рекомендации по использованию результатов диссертации. Рекомендуется использовать полученные результаты в институтах и селекционных центрах, где ведутся работы по созданию гибридных форм твердой и мягкой пшеницы с участием диких и культурных родичей. Результаты также могут быть использованы в лекционных курсах «Эволюция генома растений» и «Теория селекции» на биологических и агрономических факультетах профильных учебных заведений.

Степень обоснованности научных положений и выводов. Научные положения, изложенные в диссертации Щербаня А.Б., полностью обоснованы с применением комплекса молекулярных, цитогенетических и биоинформационных методов, соответствующих поставленным задачам и уровню аналогичных исследований, проводимых в мире. Это подтверждается публикацией результатов исследований в большом количестве статей, опубликованных в ведущих российских и зарубежных журналах. По результатам диссертации опубликовано 26 работ, из них в

отечественных и иностранных журналах из списка ВАК РФ – 23 работы. Выводы, сделанные на основе полученных результатов, полностью обоснованы.

Структура и общая характеристика диссертации

Диссертационная работа Щербаня А.Б. имеет стандартную структуру. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Материал диссертации изложен на 335 страницах машинописного текста, иллюстрирован 14 таблицами и 58 рисунками. Диссертантом детально проанализирована литература по теме исследования, список литературы включает 593 ссылки на работы, опубликованные в ведущих отечественных и зарубежных изданиях.

Во введении соискатель обосновывает актуальность проведенного исследования, степень разработанности темы исследования в мировой науке, формулирует цель, основные задачи и положения, выносимые на защиту, показывает научную новизну и значимость проделанной работы.

В первой главе представлен обзор литературы, в котором обобщены данные, касающиеся распространения аллополиплоидов среди высших растений, структуры их генома, механизмов формирования и реорганизационных процессов, происходящих в составе различных компонентов аллополиплоидного генома. Наиболее подробно описано поведение тех компонентов, которые изучены в диссертации: мобильных элементов различных классов, семейств генов рРНК и гена *VRN-1*. Последний охарактеризован в рамках отдельной, большой подглавы литературного обзора, посвященной детальному анализу генетических механизмов, контролирующих продолжительность вегетационного периода у диплоидных и полиплоидных видов высших растений.

Во второй главе диссертантом подробно описываются методы, применяемые при проведении исследования. Хочется отметить широкий спектр использованных методов, включающих целый набор современных и классических молекулярно-генетических методов, а также методов современной цитогенетики. Также в работе используется широкий набор современных программ для анализа нуклеотидных последовательностей.

В третьей и четвертой главе представлены полученные соискателем результаты и их обсуждение.

Достоинством работы является то, что в конце каждого раздела\главы дано краткое заключение, что значительно облегчает восприятие большого и разнообразного массива данных, полученных соискателем.

Соискателем описываются и обсуждаются полученные данные по идентификации и анализу нового LTR-ретроэлемента у полиплоидных и диплоидных видов риса малоизученного комплекса *officinalis*. Показано, что у аллополиплоидных видов комплекса *officinalis* сохраняются паттерны организации мобильного элемента, которые были характерны для исходных диплоидных видов.

Крайне интересно, что аналогичные данные по сохранению специфической субгеномной организации геном-специфичных ретроэлементов в составе аллополиплоидов в ходе их эволюции были показаны для гексаплоидной мягкой пшеницы. В связи с этим соискателем предлагается интересная гипотеза, что такая организация и распределение диспергированных мобильных элементов создает уникальный для каждого субгенома «ландшафт» (landscape), препятствующий спариванию гомеологичных хромосом и обеспечивающий их правильное расхождение в ходе мейоза.

Следующей частью диссертационной работы Щербаня А. Б. являются исследования геномных изменений на ранних стадиях аллополиплоидизации у синтетических аллополиплоидов пшеницы. Анализ кодирующих тандемных повторов, а именно генов 45S и 5S рРНК, позволил выявить количественные изменения, главным образом, связанные с элиминацией части неэкспрессирующихся генов в составе одного из субгеномов аллополиплоидов. Этот важный результат подтвержден различными методами (FISH, Саузерн-гибридизация).

Крайне интересной частью работы является анализ гомеологичных генов *VRN-1* у видов пшеницы разного уровня ploидности. Здесь следует, в первую очередь, отметить работу соискателя, выполненную на уникальном материале околоизогенных линий и показавшую прямое влияние первого интрона *VRN-1* на транскрипционную активность гена и сроки колошения. Следует отметить, что до этой работы влияние данного регуляторного района было показано лишь косвенно, на основании выявления мутаций в этом районе *VRN-1* у некоторых яровых образцов пшеницы.

Важное практическое значение имеет разработанная соискателем система диагностических маркеров, позволяющая идентифицировать различные гомеоаллели *VRN-1*. С использованием данного набора маркеров проведен обширный анализ

различных образцов диплоидных и полиплоидных видов пшениц. Этот анализ позволил установить основную особенность дивергенции локусов *VRN-1*, а именно, что при полиплоидизации происходило независимое от диплоидных предшественников формирование ярового образа жизни путем возникновения новых гомеоаллелей *VRN-1*, различающихся по уровню своей экспрессии и степени влияния на фенотип. Другой важный вывод связан с тем, что распространению этих аллелей и их сочетаний способствовал отбор человеком яровых образцов, адаптированных к тем или иным условиям в широком диапазоне климатических зон: от южных субтропиков до зоны умеренного климата.

Выводы, сделанные соискателем, хорошо аргументированы и полностью соответствуют полученным данным, а также сформулированным целям и задачам работы. Текст автореферата соответствует содержанию диссертации.

Отмечая достоинства диссертационной работы, ее практическую значимость и научную новизну, можно высказать некоторые **замечания**:

1) К сожалению, в выводах диссертации Щербаня А. Б. не получили отражение результаты проведенного им анализа некодирующих сателлитных повторов и RAPD-маркеров у одного из синтетических аллополиплоидов. Данные результаты не согласуются с прежними данными, показавшими количественные изменения семейств тандемных повторов у других гибридов (Salina et al. 2006). Тем не менее, отрицательный результат - тоже результат и его можно было бы отразить в выводах (соответственно переформулировать задачу - расширив ее до изучения кодирующих и некодирующих тандемных повторов);

2) В пункте 4 выводов «- продемонстрирована роль 1-го интрона в определении уровня транскрипции *VRN-1* гена и связанного с этим уровнем срока колошения у яровых форм.» На наш взгляд, пока можно говорить только о возможной роли интрона I, поскольку прямо это не показано. Для этого требуются дополнительные эксперименты с использованием генно-инженерных подходов;

3) Пункт 6 выводов: «показано, что широкое распространение мягкой пшеницы в различных климатических зонах обусловлено определенными сочетаниями гомеоаллелей *VRN-1*, определяющими оптимальное время колошения для того или иного региона.» Пока также рано говорить о прямой связи между определенными гаплотипами и оптимальным сроком колошения, поскольку на данном материале

нельзя полностью отрицать влияние других генов на срок колошения. Можно говорить о корреляции между гаплотипами и тем или иным сроком;

4) В разделе «Материалы и методы» кажется избыточным крайне подробное описание стандартных методик (тотальной ДНК, ДНК плазмид ВАС-клонов, получения компетентных клеток и др);

5) На рис.41 необходимо предоставить данные по референсному гену *Ubc*.

Минорные замечания:

1) на рис. 32 не обозначен сайт инициации транскрипции, но он есть в подписях к рисунку;

2) в диссертации порядок обозначения типов геномов мягкой пшеницы ВВААDD, хотя более употребимо обозначение ААВВDD;

3) не совсем удачны фразы « В качестве маркера использована «лестница 100 п.н.», «Диплоидные виды *Triticum*- предшественники А-генома» (стр.179). Может быть добавить « у аллоплоидов»?

4) для легкости восприятия текста на стр.218-220 помимо обозначений образцов (TMU, TQ) нужно было дать видовые названия с обозначениями геномов;

Высказанные замечания, однако, не касаются основных результатов диссертационной работы, определяющих ее новизну и научную значимость и не снижают общей высокой положительной оценки диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Щербаня Андрея Борисовича «Эволюционные аспекты формирования аллополиплоидных геномов злаков» является завершенной и оригинальной научно-исследовательской работой, отличается новизной и актуальностью. Она полностью соответствует уровню современных биологических исследований. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Выполненные исследования позволили соискателю получить фундаментально значимые результаты, внесшие вклад в современные представления об эволюции и механизмах формирования аллополиплоидных геномов растений, роли отдельных компонентов генома в этих механизмах. Приведенные в работе научные положения, выводы и рекомендации аргументированы, основаны на фундаментальных научных положениях, общепринятых теоретических закономерностях, опираются на экспериментальные данные и являются их логическим следствием. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

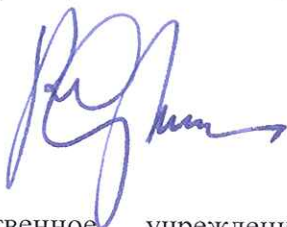
Основные результаты представлены в 23 научных работах, опубликованных в ведущих российских и иностранных журналах.

По уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа Щербаня Андрея Борисовича «Эволюционные аспекты формирования аллополиплоидных геномов злаков» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении 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 доктора биологических наук, а ее автор Щербань А.Б. заслуживает присуждения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории системной биологии растений, протокол № 5 от 12 октября 2017 г.

Заведующий лаборатории системной биологии
растений Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук (ФИЦ Биотехнологии РАН),

Академик РАН



Скрябин К.Г.

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Адрес: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

Тел +7 (495) 954-52-83

Факс+7 (495) 954-27-32

e-mail: info@fbras.ru