

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
НА ДИССЕРТАЦИЮ СТРЫГИНОЙ КСЕНИИ ВЛАДИМИРОВНЫ
«РЕГУЛЯЦИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ У ВИДОВ ТРИБЫ TRITICEAE»,
ПРЕДСТАВЛЕННУЮ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ:
03.02.07 – ГЕНЕТИКА**

Актуальность тематики, связанной с изучением генетического контроля флавоноидов у видов трибы Triticeae, обусловлена тем, что флавоноиды являются одними из наиболее значимых вторичных метаболитов растений, играющих важную роль в регуляции онтогенеза, а также защите от различных стрессорных факторов. Широкий спектр биологических свойств флавоноидов определяет, наблюдаемый в последнее время, повышенный интерес к биохимическим, физиологическим и генетическим основам их биосинтеза. Метаболические пути биосинтеза флавоноидных соединений достаточно хорошо изучены. Также наблюдается большой прогресс в понимании молекулярно-генетических механизмов, контролирующих биосинтез флавоноидов растений, в том числе и сельскохозяйственных видов: определены последовательности ключевых генов пути биосинтеза флавоноидов, идентифицированы их паралогичные и гомеологичные копии. Но, несмотря на это, механизмы регуляции экспрессии данных копий генов в различных органах и тканях до сих пор исследованы достаточно слабо.

В диссертационная работа Стрыгиной Ксении Владимировны изучалась регуляция тканеспецифической экспрессии генов биосинтеза флавоноидов у видов трибы Triticeae. В работе были **впервые** для данной трибы описаны гены семейства WD40, регулирующие биосинтез флавоноидов. Были проанализированы филогенетические связи и оценены скорости эволюции трех основных семейств регуляторных генов R2R3-Myb, bHLH-Myc и WD40, определяющих контроль синтеза флавоноидов. **Впервые** было показано, что

функциональный аллель Мус-кодирующего гена HvMusc2 ячменя, является ключевым регулятором синтеза антоцианов в алейроновом слое зерна. **Впервые** был проведен анализ паттернов метилирования промоторов регуляторного и структурных генов. В результате анализа паттернов метилирования промоторов генов *TaMusc-A1*, *F3H* и *CHI* мягкой пшеницы было показано, что особенности метилирования данных областей не определяют тканеспецифичный характер регуляции экспрессии этих генов биосинтеза флавоноидов.

Диссертационная работа, изложенная на 157 страницах, имеет стандартную структуру: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, глава, содержащие результаты по основным направлениям работы и глава обсуждения полученных данных; далее представлены заключение, выводы, и список литературы (243 источника); имеется объемное приложение, в котором приводится список используемых образцов, с указанием окраски зерна, список проанализированных генов, структуры белков, данные о действующие регуляторные элемент и др.

Обзор литературы, занимает 34 страницы текста диссертационной работы. В данной главе описываются механизмы регуляции экспрессии генов, дуплицирование генов и геномов, а также дальнейшая эволюционная судьба дуплицированных генов. Значительное внимание диссертант уделяет генам биосинтеза флаваноидов и их регуляции у растений. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии рассмотренных проблем и свидетельствует о хорошей теоретической подготовке диссертанта.

Следующий раздел содержит подробное описание используемых в работе **материалов и методов исследования**. В ходе выполнения работы диссертантом был применен внушительный арсенал современных методов молекулярной генетики.

В главе 3 приводятся полученные **результаты**. Диссертантом проведена идентификация и определение структурной организации регуляторных генов MBW-комплекса трибы Triticeae. Особый интерес вызывают полученные

данные о генах семейства *WD40*, регулирующие биосинтез флавоноидов, которые для данной трибы были охарактеризованы впервые.

На основании известных генов-регуляторов биосинтеза антоцианов в геномах видов трибы Triticeae было выявлено две группы последовательностей гена *Myb* (на хромосомах 2 и 4). Проведенный диссертантом анализ показал, что дубликации *Myb* на хромосоме 2 происходили после дивергенции родов *Triticum/ Aegilops* и *Hordeum*, а на хромосоме 4 основные дубликации происходили до их дивергенции. Анализ генов регуляторного комплекса MBW, включающего гены семейств *R2R3-Myb*, *bHLH-Myb* и *WD40*, выявил значительные различия в их вариабельности: у представителей трибы Triticeae гены *WD40* более консервативны в отличие от быстро эволюционирующих генов *R2R3-Myb* и *bHLH-Myb*.

Крайне важными для понимания регуляции метаболизма флаваноидов представляются полученные диссертантом новые данные об особенностях регуляции тканеспецифической экспрессии генов биосинтеза флавоноидов у злаков. Так проведенный экспрессионный анализ показал, что *Myb*-кодирующий ген мягкой пшеницы *TaMyb-B1* предположительно является фактором, определяющим антоциановую окраску coleoptily. Диссертантом впервые был проведен анализ экспрессии этого гена у линий ячменя с различной степенью окраски зерновки и было показано, что функциональный аллель *Myb*-кодирующего гена *HvMyb2* ячменя может быть ключевым регулятором синтеза антоцианов в алейроновом слое зерновки.

В ходе выполнения работы диссертантом была высказана гипотеза о том, что специфичность экспрессии отдельных копий генов биосинтеза флавоноидов может быть связана с различием паттернов метилирования одних и тех же копий в разных тканях. В связи с этим были проведены детальные исследования с использованием метода бисульфидного секвенирования промоторных областей двух генов пшеницы *TaF3H-B2* и *TaF3H-B1*, отличающихся по паттернам экспрессии у сорта Саратовская 29. Однако сравнение уровня метилирования промотора одного и того же гена в корне и coleoptile, показало, что регуляция экспрессии этих генов не связана с

метилованием. Аналогично не было разницы в статусе метилирования у промоторов гена ТаМус-А1.

Необходимо отметить, что все представленные результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы.

Глава 4. включает **обсуждение** полученных результатов. Так, при обсуждении эволюция генов MBW-комплекса достаточно интересным и логичным кажется предположение диссертанта то о том, сохранение в геномах трибы Triticeae большого числа высокоомологичных копий генов bHLH типа Мус, чем генов Муб могло бы указывать на их специализацию в синтезе различных классов флавоноидов в разных тканях.

Работа представляет собой целостное завершенное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Выверенная логика проведенных экспериментов обеспечивает достаточно четкую логику изложения. Иллюстративный материал удобен для понимания. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются экспериментальными данными.

Важно отметить, что данная диссертационная работа расширяет существующие представления о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе появления антоциановой окраски различных органов ячменя и пшеницы.

К работе возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Хотя в работе было идентифицировано и проведен структурный анализ большого количества генов, нигде, ни в тексте диссертации, ни в автореферате не упоминаются размеры анализируемых генов, экзон-интронная структура, уровень их полиморфизма, количества замен
2. Не указано, сколько клонов одного образца было секвенировано.
3. Статистическая значимость определялась с помощью критерия Краскела-Уоллиса и теста Манна-Уитни, почему нельзя было посчитать одинаково

4. Из текста не совсем ясно, зачем проводили экспрессионный анализ в условиях стресса, и почему в качестве стрессорного фактора была выбрана засуха и повышенное содержание NaCl
5. Не совсем ясно, что диссертант понимал под фразой «полиплоидизация ... ведет к исчезновению генов и повторной диплоидизации» (стр. 25)
6. В диссертации достаточно подробно, даже с некоторыми повторами, говорится о полиплоидизации и дупликации, но при этом не упоминается о палеополиплоидах
7. не ясно, что обозначают подписи « a, b, c» над столбцами на рис 16-19

Однако все высказанные замечания не умаляют значимости полученных результатов. Диссертантом проделана весьма объемная экспериментальная и теоретическая работа. **Обоснованность и достоверность заключений и выводов**, сделанных в работе, не вызывает сомнений. Результаты работы были **опубликованы** в виде трех статей в рецензируемых научных зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК и прошли **апробацию** на отечественных и международных научных конференциях. Наибольшую **теоретическую значимость** имеет идентификация регуляторных генов биосинтеза флавоноидов и определение их структурной организации и особенностей транскрипционной активности, а **практическую ценность** для селекции представляют разработанные CAPS-маркеры, которые могут быть использованы для маркер- опосредованного отбора генотипов ячменя при создании сортов с высоким содержанием антоцианов в зерне. Кроме того, данные об аллельных вариантах регуляторных генов могут быть использованы для геномного редактирования ячменя и получения сортов повышенной диетической ценностью.

Автореферат оформлен по всем правилам и отражает все основные положения представленной работы. Название вполне отражает комплекс выполненных исследований.

Заключение. Диссертационная работа Стрыгиной Ксении Владимировны «регуляция тканеспецифической экспрессии генов биосинтеза

степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.07 – генетика, является законченным научно-квалификационным исследованием. По оригинальности, новизне, достоверности материалов и сформулированным выводам работа соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Стрыгина Ксения Владимировна заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности: 03.02.07 – генетика

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории системной биологии растений, руководитель группы молекулярных методов анализа генома, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»,

д.б.н., профессор,



Кочиева Е.З.

Адрес: Россия, 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д. 7, корп.1 тел:
+7 (495) 308-99-96, доб. 234 E-mail: kochieva@biengi.ac.ru

Подпись доктора биологических наук, профессора, Кочиевой Елены Зауровны
"ЗАВЕРЯЮ"

Зам. ученого секретаря:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,

к.б.н.



Степанова Н.Г.