

ОТЗЫВ официального ОППОНЕНТА

на диссертацию Николая Александровича Жаркова «ХАРАКТЕР ПРОЯВЛЕНИЯ МОНОСОМНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ У TRITICUM AESTIVUM L. И ЕГО СВЯЗЬ С МЕХАНИЗМАМИ МЕЙОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.02.07 – Генетика

Представленная к защите диссертация Николая Александровича Жаркова изложена на 276 страницах формата А4, включает 47 рисунков, 31 таблицу, список литературы, содержащий 427 наименований. Диссертация, в целом, построена по плану, близкому к традиционному. Она включает «Введение», главы «Клеточный цикл. Митоз. Мейоз. (Обзор литературы)», «Материал, условия и методика проведения исследований», «Экспериментальная часть» (включает описание сделанных наблюдений и их обсуждение), «Заключение», «Выводы», «Список публикаций по теме <диссертации>», Список цитируемой используемой литературы и Приложения, куда вынесены 2 рисунка, копия авторского свидетельства 1982 г. на способ получения растений с двумя замещенными хромосомами и копия удостоверения на рационализаторское предложение, касающееся удаления пыли с поверхности линз светового микроскопа.

Во «Введении» диссертант констатирует, что до настоящего времени остаются не решенными два основных момента, связанных с мейозом:

«1. Накопленные экспериментальные данные не дают полного представления о системе цитогенетического контроля синапсиса хромосом и связанных с этим процессов сближения и распознавания гомологов, предотвращения синапсиса гомеологов у аллополиплоидных видов растений.

2. До настоящего периода практически отсутствуют какие-либо положения, объясняющие механизм перехода хромосом от митоза к мейозу».

Далее диссертант формулирует цель и задачи работы. Сказано, что цель работы состоит в «определении возможной связи между *характером проявления моносомного состояния хромосом в мейозе* и механизмами мейотических процессов у аллополиплоидного вида пшеницы *Triticum aestivum L.*».

Нельзя сказать, что эта формулировка ясно отражает суть работы, однако конкретные задачи исследования, сформулированные во введении, вполне конкретны:

Задачи исследования:

- изучить состав популяции серии моносомных линий сорта яровой мягкой пшеницы Мильтурум 553;
- изучить влияние дозового состояния хромосом на характер проявления конъюгации хромосом в метафазе I мейоза;
- изучить характер поведения унивалента в анафазе I у полной серии моносомных линий пшеницы;
- провести цитологический анализ диад на стадии телофазы I и профазы II;
- изучить характер проявления моносомного состояния хромосом в метафазе и анафазе мейоза II;
- провести тетрадный анализ у полной серии моносомных линий;
- путем статистического анализа полученных экспериментальных данных выявить наличие определенных связей между характером проявления моносомного состояния хромосом на различных этапах мейотического процесса;
- провести цитологические исследования мейоза у межвидовых гибридов пшеницы.

Исследования в этом направлении действительно представляются актуальными, тем более что материал, на котором проводилось исследование оригинален - это созданная в 1970-1980-х годах при участии диссертанта полная серия моносомных линий, коллекция линий на основе ярового сорта мягкой пшеницы Мильтурум 553 (Цильке и соавт., 1980).

Далее во введении формулируются представления диссертанта о научной новизне, практической и теоретической значимости работы. К ним мы вернемся в завершающей части моего отзыва.

Кроме не очень четкой формулировки цели исследования, я должен отметить одно, приведенное во введении, утверждение диссертанта с которым невозможно согласиться. Говоря о том, что отличает его работу от работ предшественников, диссертант пишет: «Проводимые исследования на моносомных линиях обычно имели фрагментарный характер и ограничивались не полным их набором с минимальной выборкой анализируемых клеток (Sears, 1952; Morrison, 1953; Лбова, 1973). При этом они носили чаще всего описательный характер» (стр. 6).

Это о чем? О сотнях работ, выполненных на моносомных линиях с привлечением самых современных методов генетики и молекулярной биологии, о исследованиях, выполненных на основе моносомных линий Сирса направленных на решение фундаментальных вопросов генетики и клеточной биологии пшеницы, на которые ссылаются тысячи раз? О работах Сирса, создавшего первую полную серию моносомных линий пшеницы и широко распространившего ее по исследовательским лабораториям всех стран, серию линий, на основе которой и была создана та серия моносомиков, с которой работал диссертант?

Обзор литературы в диссертации посвящен рассказу о молекулярных механизмах перехода клеток от стадии G2 к профазе, описанию цитологических процессов, протекающих в митозе и мейозе у растений и генетическому контролю мейоза у пшеницы. В части, посвященной молекулярным механизмам прохождения клеточного цикла и описанию процессов формирования веретена деления обзор достаточно подробный, строится на серьезных обзорных работах 2005-2014 гг. и, в основном, объективно отражает современное состояние знаний об этих процессах. Этого нельзя сказать о разделах Обзора «Генетический контроль мейотических признаков» и «Специфика мейоза у *Triticum aestivum* L.». В разделе, посвященном генетическому контролю мейотических процессов лишь упоминаются три работы, выполненные после 2000 года, а основной текст сводится к обзорам И.Н. Голубовской 1975 и 1997 гг.

Еще хуже обстоит дело с последней главой обзора литературы «Специфика мейоза у *Triticum aestivum* L.». Эта глава должна была бы быть одной из основных в диссертации, так как имеет прямое отношение к теме предпринятого экспериментального исследования. В главе разбирается происхождение субгеномов аллополиплоидного кариотипа *T. aestivum*, рассказывается, как идентифицировали хромосомы пшеницы. Почти 7 страниц текста посвящено генетическому контролю подавления конъюгации гомеологических хромосом в мейозе пшеницы. В главе 142 ссылки на публикации, из них только 5 публикаций XXI столетия (2 обзора 2005 года, ссылка на книгу Н.П. Гончарова 2002 г., на статьи Liu et al., 2003 и Ozkan & Feldman, 2001). Нет ни одной ссылки на статьи, изданные за последние 15 лет. Между тем в этот период кардинально изменился уровень разрешения цитогенетического анализа. Методы дифференциального окрашивания хромосом, GISH, методы секвенирования полиморфных маркеров ядерного и хлоропластного геномов, методы анализа геномов и транскриптомов открыли совершенно новые возможности для изучения происхождения пшениц.

Приведем лишь несколько существенных публикаций, рассмотрение которых могло бы войти в эту главу: Badaeva et al. Chromosomal changes over the course of polyploid wheat evolution and domestication // *Advances in Wheat Genetics: From Genome to Field*. Tokyo: Springer, 2015. 83-89; Wang et al. "Transcriptome asymmetry in synthetic and natural allotetraploid wheats, revealed by RNA-sequencing // *New Phytologist*. 2016. 209.3: 1264-1277; Zhang et al. Molecular cytogenetic and genomic analyses reveal new insights into the origin of the wheat B genome // *Theoretical and Applied Genetics*. 2018. 131.2: 365-375 и многие др.

Вывод однозначен: глава «Специфика мейоза у *Triticum aestivum* L.» не отражает современного уровня знаний о происхождении субгеномов пшеницы, о генетическом контроле конъюгации ее хромосом.

Незнание современных исследований характерно не только для главы «Обзор литературы». Когда диссертант на стр. 85 пишет: «К сожалению, в последнее десятилетие исследования с использованием анеуплоидных методов анализа существенно сократились. В то же время их возможности так и не были до конца использованы» - с этим нельзя согласиться.

Чтобы не быть голословным, приведу несколько работ, где этот метод использовался в недавнее время для решения самых разных проблем генетики пшеницы: Liu et al. (2017) Analysis of aneuploid lines of bread wheat to map chromosomal locations of genes controlling root hair length// *Annals of Botany*. 119 (8): 1333-1341; Zhang et al. (2017) Global analysis of gene expression in response to whole-chromosome aneuploidy in hexaploid wheat// *Plant Physiol*. 2017: pp-00819; Kolmer et al. (2018) Adult plant leaf rust resistance derived from the wheat landrace cultivar Americano 44d is conditioned by interaction of three QTL // *Euphytica*. 214 (3): 59; Geng et al. (2012) Development of functional markers for a lipoxygenase gene TaLox-B1 on chromosome 4BS in common wheat// *Crop Science*. 52 (2): 568-576; Allen et al. (2011) Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.)// *Plant biotechnology journal*, 9(9): 1086-1099; He et al. (2008) Characterization of phytoene synthase 1 gene (Psy1) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker // *Theor. Appl. Genet*. 116 (2): 213-221.

В обзоре литературы встречаются неверные или неточные выражения, часто связанные с буквальным или неточным переводом первоисточника. Приведем несколько конкретных примеров:

Стр. 26. НАПИСАНО: «Микротрубочки являются гетеродимерами, составленными из альфа- и бета-тубулина. При этом бета-тубулин

располагается в одном конце микротрубочки (плюс-конец), а альфа-тубулин – в другом (минус-конец) (Desai & Mitchison, 1997). – В действительности микротрубочки составлены из гетеродимеров альфа- и бета тубулинов, при этом в каждом гетеродимере бета-мономер ориентирован в сторону плюс-конца микрофиламента.

Стр. 27. Написано: «Маленькие кинетохоры у почкующих (так в диссертации!) дрожжей связываются с единственной микротрубочкой. Эти кинетохоры состоят из 60 подъединиц, организованных во множество подкомплексов (McAinsh et al., 2003)». - О чем идет речь понять невозможно. Обратившись к первоисточнику, видим, что «подъединицы» – это протеины: «A those in budding yeast, contain at least 50, and perhaps as many as 75, different protein subunits».

Стр. 28 НАПИСАНО: «У почкующих (!) дрожжей центромера определяется в пределах 125 последовательностей bp (basepair) ДНК. У высших эукариотов количество последовательностей нуклеотидных пар намного больше (примерно около 1 Mbp) и состоит в основном из повторных элементов, главным образом гетерохроматина (Amor et al., 2004; Biggins & Walczak, 2003)». – Складывается впечатление, что буквосочетание «bp» в этой фразе - название последовательности.

Стр. 28. НАПИСАНО: «Кинетохоры многоклеточных организмов собраны из повторных подъединиц (Zinkowski, 1991), где каждое повторение могло бы отразить модуль единицы кинетохора дрожжей» – совершенно неверное предположение.

Стр. 15. НАПИСАНО: «Циклин-зависимые киназы (CDKs) - относительно маленькие белки, с молекулярными массами в пределах от 34 - 40 килодалтонов, и содержат в себе немного больше, чем область киназы (Morgan, 2007)» – ?

Стр. 29. НАПИСАНО: «сбор белка на кинетохорах зависит от многих ветвей и является взаимосвязанным» – ?!

Стр. 36. НАПИСАНО: «В лептотене каждая хромосома удвоена и состоит из двух сестринских хроматид. В результате их общий количественный состав равен $4n$ » - Почему $4n$? Число хромосом у диплоидного организма в соматических клетках $2n$ (см., например: John, B. & Lewis, K.R. The chromosome complement // *Protoplasmatologia*. 1968. Bd. 6. S. 61. Дословно: “Typically chromosomes in diploid organisms or diploid stages of organisms ($2n$) consist of two sets of identical partners ($2x$)”). На стадии G1 в интерфазе у диплоидного организма каждая хромосома состоит из одной хроматиды, число хромосом $2n$, на стадии G2 и в профазе митоза в каждой

хромосоме 4 хроматиды, число хромосом $2n$. Сколько хромосом у диплоидного организма в лептотене? Ответ: $2n$, хроматид в 2 раза больше.

Стр. 38 НАПИСАНО: «Следующая за лептотеной стадия пахитены характеризуется, прежде всего, максимальным развитием синаптонемального комплекса» – пропущена стадия зиготены.

Стр 39. Написано: «В диакинезе хромосомы утрачивают свою связь с оболочкой ядра. Данная стадия является заключительной профазы мейоза» - Связей хромосом с ядерной оболочкой нет уже в диплотене.

Стр. 85. «менделеевское расщепление».

Некоторые из неудачных выражений связаны с буквальным переводом первоисточника:

Первоисточник	Текст в диссертации
Miller et al., 2012: ...this specialized chromosome segregation pattern requires three changes that modulate how chromosomes interact with each other and with the microtubule cytoskeleton: (1) reciprocal recombination between homologous chromosomes, (2) the way linkages between sister chromatids, known as sister-chromatid cohesion, are removed from chromosomes and (3) the manner in which chromosomes attach to the meiotic spindle. Homologous recombination is initiated by programmed double-strand breaks (DSBs), which are catalyzed by Spo11 following premeiotic DNA replication (Keeney et al., 1997).	стр. 42: «Таким образом, по определению, данному М.П. Миллером с соавторами (Miller et al., 2012), мейотический тип деления хромосом требует следующих трех необходимых <u>изменений</u> : 1. Взаимная перекомбинация между гомологичными хромосомами; 2. <u>Способ удаления</u> связи между сестринскими хроматидами, <u>известными как</u> когезия сестринских хроматид; 3. <u>Манера, с которой хромосомы прикрепляются</u> к мейотическому веретену. Рекомбинация начинается запрограммированными двойными смежными разрывами (DSBs), которые катализируются Spo11 после предмейотической репликации ДНК (Keeney et al., 1997).
Hauf and Watanabe, 2004: Firstly, <...> two kinetochores in very close proximity in a side-by side arrangement (Figure 3). Secondly, recombination during meiotic prophase results in chiasmata which together with the	Стр. 43. Но при этом хромосомы должны обладать следующими особенностями (Hauf and Watanabe, 2004): 1. Два кинетохора располагаются в непосредственной близости сторон «бок-о-бок», что

<p>cohesion between sister chromatids keep homologous chromosomes connected. <...> Thirdly, <...> arm cohesin has to be removed, but cohesin in the centromeric region is preserved, which is necessary for the biorientation <...> in meiosis II</p>	<p>облегчает движение сестринских хроматид к одному полюсу. 2. <u>Формирование хиазм при рекомбинации, которые обеспечивают физическую связь, необходимую для биполярного прикрепления гомологов.</u> 3. Когезия плеч должна быть устранена в мейозе I, но сохранена в центромерном регионе, <u>необходимая для биориентации в мейозе II.</u></p>
---	---

Сведения, взятые из разных источников, в тексте обзора литературы иногда не согласованы. Так на стр. 15 в абзаце 2 читаем: «Циклин-зависимые киназы (CDKs) - относительно маленькие белки, с молекулярными массами в пределах от 34 - 40 килодальтонов <...> (Morgan, 2007). А в следующем абзаце: «Циклины включают в себя около 30 белков с массой от 35 до 90 килодальтонов (Malumbres, 2014)».

Раздел Материал и методы написан очень кратко. Дается краткая характеристика сорта Мильтурум 553, рассказано, как получали материал для исследования мейоза у серии моносомиков. Во всех случаях при работе использовалось только рутинное окрашивание хромосом ацетокармином что значительно снижает доказательность работы, поскольку при рутинном окрашивании практически невозможно идентифицировать многие хромосомы в кариотипе *T. aestivum*.

Экспериментальная часть работы и обсуждение полученных результатов описаны на 157 страницах. Диссертант провел большую работу по микроскопическому исследованию влияния моносомии по каждой из хромосом *T. aestivum* на поведение хромосом в мейозе I и мейозе II. Наиболее значимым экспериментальным результатом, полученным диссертантом, по нашему мнению, является то, что была подсчитана частота трех типов расхождения хромосом в анафазе I у моносомиков по всем хромосомам. Диссертант пишет о трех вариантах сегрегации моносом: 1) примерно в 50% случаев в 1-м делении мейоза унивалент (моносома) движется к одному из полюсов, 2) унивалент остается в районе экваториальной области клетки и попадает в микроядро; 3) у унивалента наблюдается расхождение не только плеч хромосом но и перицентромерных

районов хромосом уже в 1-м делении мейоза (эквационное деление вместо редукционного). Очень интересно описание необычного, но встречающегося у аллополиплоидов явления – поперечного деления центромеры (centromere misdivision) – явления, лишь фрагментарно исследованного с привлечением современных методов (Lukaszewski, 2010; Логинова. Силкова, 2014; Silkova, Loginova, 2016).

Оригинальный материал дал возможность Автору сделать наблюдения важные, интересные. И жаль, что Автор диссертации, как правило, обсуждает их в самом общем виде, используя термины – гены-промоторы спаривания, гены-супрессоры хиазм, гены, влияющие на синапсис гомеологов, однако никаких возможностей оценить справедливость выдвигаемых предположений и гипотез нет, поскольку в работе полностью отсутствует гибридологический анализ.

При этом, к сожалению, наблюдаемые картины расхождения в каждой из линий моносомиков не иллюстрируются микрофотографиями. Фотографий всего несколько, они лишь показывают конфигурацию хромосом в анафазе I у моносомиков, когда не отходит один, два или три унивалента (рис. 4.1, 5.1), анафазы I с одной или двумя отставшими хроматидами (рис. 5.2, 5.3, 5.5), микроядра (рис. 5.4) . При этом ни в одном случае не указано, клетка с моносомией по какой хромосоме на фото, нигде не показана шкала, которая позволила бы оценить размеры клеток и хромосом.

Результаты наблюдений сведены Диссертантом в 31 таблицу, однако некоторые из них уже были представлены научной общественности при защите кандидатской диссертации в 1997 году, однако соответствующих ссылок не имеют.

Таблица 3.2 докторской диссертации «Частота и типы анеуплоидных форм в потомстве самоопыленных моносомных линий сорта Мильтурум 553» уже опубликована в автореферате 1997 г. как таблица 1.

Таблица 4.6 докторской диссертации «Процесс стабилизации метафазы I мейоза в потомстве само-опыленных сестринских дисомиков» это таблица 3 автореферата 1997 года.

Таблица 5.7 докторской диссертации «Образование мультивалентов в метафазе I мейоза у моносомиков и сестринских дисомиков по «критическим» хромосомам сорта Мильтурум 553» - это таблица 2 автореферата 1997 г.

Таблица 3.1 (стр. 77) в представленной к защите докторской диссертации, показывает частоту моносомиков в потомстве самоопыляемых моносомных линий Мильтурум 553. В таблице 3.2 (стр. 78), составленной на

основании тех же самых опытов, на той же выборке (сравнить столбцы 1 и 2 этих таблиц), но доля моносомиков в этих таблицах разная (сравнить столбцы 3). Чтобы получить одинаковые цифры, в таблице 2 надо сложить % моносомиков + % нуллисомиков + % растений с телоцентрической хромосомой + % гипо- и гиперанеуплоидов. Как это понимать? Почему тогда таблица 3.1 анонсирована как сводка данных по числу моносомиков в потомстве?

Таблица 3.2 обсуждаемой диссертации, как уже сказано, воспроизводит таблицу 1 автореферата кандидатской диссертации, но с важным изменением: хромосома 4А кандидатской диссертации теперь отнесена к В-субгеному, а 4В – к А-субгеному, что сказалось на суммарных числах по субгеномам. Почему?

Данные о доле моносомиков в потомстве Мильтурум 553 по 5 хромосомам (рассчитанных так, как в таблице 3.1) повторены в таблице 3.3, но доля моносомиков по хромосоме 5В здесь 81.43%, а не 83.4%, как в табл. 3.1. Какая цифра правильнее?

В таблице 4.3 диссертации, по-видимому, ошибка в названиях столбцов: количество бивалентов на клетку и количество палочковидных бивалентов, указано «шт.», но данные – в тысячных долях от единицы.

Формула расчета частоты униполярной ориентации при движении унивалента, приведенная на стр. 128, или неверна или изложена настолько нечетко, что не позволяет получить цифры, рассчитанные на основании данных таблицы 5.2 и приведенные автором в таблице 5.1.

Пример: расчет для хромосомы 2А:

K_i – количество клеток без отстающих элементов – 2081×0.5757

N_i – общее количество проанализированных клеток в анафазе I поздней - 2081

X_j – процент клеток с хроматидами на ранней стадии анафазы I – $7.0 + 2.02 = 9.02$

Подставляем все эти значения в формулу

$$K(u) = \{[K_i - (N_i \cdot X_j)/100]/K_i\} \cdot 100,$$

$$K(u) = \{[2081 \times 0.5757 - (2081 \times 9.02)/100]/2081 \times 0.5757\} \times 100 = 84.332$$

В таблице 5.4 совсем другое число – 56.85. Почему? Вероятно, диссертант подставляет в формулу иные цифры? Какие?

На странице 131, отталкиваясь от наблюдения, что у всех моносомиков униполярное расхождение моносомика наблюдалось примерно

в 50% случаев (интервал 39-62% по разным хромосомам), а сестринские хроматиды расходились к разным полюсам в 19% случаев (интервал 7-35%), диссертант делает два предположения (называя их «выводами»): «1) хромосомы гомологичных пар имеют два различных механизма перехода с биполярной ориентации на униполярную; 2) относительной автономностью коориентации связи центромер с полюсом обладает один из гомологов, в то время как второму гомологу для этого требуется наличие партнера, т.е. конъюгация».

Совершенно неочевидным кажется предположение, что «не бивалентное состояние гомологов определяет редукционный тип их расхождения, а, наоборот, смена полюсной ориентации одного из гомологов определяет синاپсис хромосом». Эти наблюдения имело бы смысл обсудить на основании работ, в которых с использованием современных методов молекулярной цитогенетики и иммуноцитохимии изучались особенности центромеров, расходящихся в мейозе I по эквационному и редукционному типу (в частности, работы: Silkova, O.G., Shchapova, A.I., Shumny, V.K. (2011) Patterns of meiosis in ABDR amphihaploids depend on the specific type of univalent chromosome division // *Euphytica*, 178(3), pp.415-426; Логинова, Д.Б., Силкова, О.Г. (2014) Митотическое поведение центромер в мейозе как механизм восстановления фертильности у пшенично-ржаных амфигаплоидов // *Генетика*. 50(8): 930-930; Silkova, O.G., Loginova, D.B. (2016) Sister chromatid separation and monopolar spindle organization in the first meiosis as two mechanisms of unreduced gametes formation in wheat-rye hybrids// *Plant reproduction*. 29(1-2): 199-213), однако этого сделано не было, ссылок на эти или аналогичные работы в диссертации нет.

К стр. 138. Одним из следствий предлагаемой автором гипотезы о механизмах расхождения хромосом в мейозе I должно быть регулярное наличие трехполюсного веретена в ранней профазе I. Со ссылкой на работу Натальи Владимировны Шаминой (1989) диссертант пишет, что именно трехполюсное веретено «часто наблюдается у растений при нормальных мейотических процессах». Однако, как мне кажется, в работе, специально посвященной многополюсным веретенам в мейозе растений (Шамина и соавт. (2006) *Цитология* 48:114-119) Н.В. Шамина рассматривает многополюсные веретена нескольких типов как аномалию мейоза, наблюдаемую у отдаленных гибридов, у некоторых мутантов и у растений, подвергнутых разного рода экстремальным воздействиям. Как аномалию рассматривают три- и многополюсные веретена деления и другие авторы (напр.: Rana, P.K., Kumar, P., Singhal, V.K. (2013) Spindle irregularities,

chromatin transfer, and chromatin stickiness during male meiosis in *Anemone tetrasepala* (Ranunculaceae) // *Turkish J. of Botany*, 37(1): 167-176.).

Одной из интересных частных проблем современной клеточной биологии является механизм поперечного деления центромеры (centromere misdivision), впервые описанный Дарлингтоном в 1939 году. Реальность этого феномена в клетках животных часто не подтверждается (см., напр.: Wolf et al. (1996) Molecular definition of breakpoints associated with human Xq isochromosomes: Implications for mechanisms of formation // *Am. J. Hum. Genet.* 58:154-160), но в мейозе растений, “misdivision” действительно происходит (Lukaszewski A.J. (2010) Behavior of centromeres in univalents and centric misdivision in wheat // *Cytogenet Genome Res.* 129: 97–109; . Guo, X. et al. (2016) De novo centromere formation and centromeric sequence expansion in wheat and its wide hybrids // *PLoS Genetics*, 12(4), p.e1005997). Обсудить его механизмы на основании современных представлений об организации хромосомы было бы вполне возможно и желательно. Однако диссертант ограничился упрощенными представлениями, взятыми из книги Бостока и Самнера (1981), согласно которым в районе центромеры существует «две пары твердых телец» (стр. 139) разрыв между которыми и даст поперечное деление центромеры.

Развиваемая авторам гипотеза о том, «что пусковым механизмом перехода хромосом от митоза к мейозу служат структурные изменения в зоне исходного полюса, приводящие к коордации центромер; при этом активно задействованным оказывается только один гаплоидный набор, в то время как второй сохраняет свою прежнюю митотическую ориентацию» оригинальна и имеет все права на существование. Однако она не обсуждена с привлечением данных, полученных с использованием методов современной молекулярной цитогенетики (иммуноцитохимии, GISH, FISH) и не подтверждается результатами известных мне исследований.

Косвенно, на то, что она не согласуется с современными представлениями о процессах, происходящих в профазе мейоза I, служит то, что работа с описанием этой модели была опубликована диссертантом в журнале «Цитология и генетика» 17 лет назад, но не была включена в научный оборот. За прошедшее со дня публикации время на работу сослались 4 раза – 3 раза сам диссертант и 1 раз исследователи из Барнаула Л.П. Хлебова и Н.В. Барышева в статье «Рекомбиногенез и продуктивные свойства пентаплоидных гибридов пшеницы», опубликованной в *Acta Biologica Sibirica*. 2016. Т. 2. №3. С. 61-72.

Некоторые из утверждений диссертанта по меньшей мере странны, например, на стр. 152 читаем: «Согласно законам статистики (Гмурман, 1963; Колмогоров и др., 1982), вероятность того, у какого из двух гомологов точки фиксации центромер окажутся активно задействованы, во всех случаях должно составлять 50 : 50 %». Известно, что у отдаленных гибридов растений нити веретена связаны преимущественно с центромерами хромосом одного из предковых видов и не взаимодействуют с хромосомами другого «родителя» - см., напр.: Gernand, D. et al. (2005) Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation //The Plant Cell. 17(9): 2431-2438. Что же, м.б. «законы статистики» Гмурмана и Колмогорова не верны?

Наконец, надо отметить определенную небрежность в написании латинских названий растений и фамилий авторов работ: стр. 53 – *Triticum urartum* – *T. urartu*; стр. 67 -*Puccinia striiformis* – надо *Puccinia striiformis*, стр. 70 *Triticum vulgare* – надо *Triticum vulgare*.

По всему тексту неверное написание фамилии Б. Льюина (везде, кроме списка литературы, Льюн), по тексту и в списке литературы более 10 раз неправильно написана фамилия Н. Kihara, что особенно странно, учитывая что Кихара – классик в области цитогенетики пшеницы.

По тексту диссертации и в списке литературы фамилия И.Н. Голубовской, почему-то дается в такой транскрипции: Golubovskay, I.N. Alleles of *afd1* dissect REC8 <...> meiotic prophase I / I.N. Golubovskay // J. Cell Sci.. – 2008. – V.119. – P. 3306-331).

Неверно написание фамилии одного из авторов «Генетического и цитогенетического словаря» – в списке литературы написано Ригер Р., Михаэли, А., а в тексте диссертации (стр. 106), еще и вариант Михаэлио – надо Михаэлис.

На стр. 113 видим «полимерные признаки».

Автор пишет, что результаты его диссертационной работы опубликованы в 10 статьях, напечатанных в журналах, рекомендованных ВАК. На сайте ВАК vak.ed.gov.ru в списке, озаглавленном «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (по состоянию на 16.04.2018)» нет журнала «Фундаментальные исследования» (биол. науки), а журнал «Современные проблемы науки и образования» входит в список ВАК только с 9.02.2016 по 1.01.2018), поэтому число статей диссертанта,

опубликованных в журналах из Списка ВАК не 10, а 7.

Проанализируем выводы, представленные в диссертации.

Вывод 1. «Установлено, что отклонения сестринских дисомиков от рекуррентного родителя обусловлены переопределением генетических связей, вызванных моносомным состоянием хромосом. Для полного восстановления генотипа в ряде случаев требуется несколько регенераций. Использование сестринских дисомиков в цитогенетических исследованиях может быть принято как способ, позволяющий устанавливать характер действия и взаимодействия генов, контролирующими мейотические признаки».

Формулировка вывода неясна. Какие «генетические связи» были утрачены у моносомика и какие «связи» восстанавливались?

На стр. 99 диссертации автор пишет: «Таким образом, результаты проведенных исследований убедительно показали, что отклонения сестринских дисомиков от рекуррентного родителя не связаны с проявлением каких-либо сформировавшихся в результате отбора компенсаторных комплексов генов, а является прямым следствием моносомного состояния хромосомы в предыдущем поколении. Восстановление ее двойной дозы в количественном отношении не равнозначно таковому в качественном выражении. <...> В тех случаях, когда хромосома играет более весомую роль в том или ином явлении, отсутствие одной ее дозы вызывают и более глубокие изменения в общей цепи детерминирующих их генетических факторов, для восстановления которых требуется более длительный промежуток времени» (стр. 99). – Иными словами, диссертант полагает, что пока в геноме некоторая хромосома находилась в моносомном состоянии, в «генофоне» (как называет генотип или, м.б., эпигенотип ? диссертант), произошли некоторые изменения. Восстановление дозы генов моносомика в кариотипе дисомика - недостаточное условие для восстановления нормального протекания процессов в профазе 1 мейоза, реверсии к уровню, характерному для исходной линии. Восстановление происходит, но лишь через поколение или через несколько поколений. Наблюдение, несомненно, интересное, заслуживающее дальнейшего исследования, но то, что это связано именно с «переопределением генетических связей», как вынесено в раздел «Положения, вынесенные на защиту» и в вывод 1 в диссертации, не установлено.

Вывод 2. «Установлено, что конъюгация хромосом контролируется большим количеством генов, включающих гены промоторы и ингибиторы, гены с автономной функциональной активностью и с сопряженным типом действия, обладающие и не обладающие одинаковой экспрессивностью в одной и двух дозах».

Вывод 2 не вытекает из результатов данной работы. Разумеется, из общих соображений ясно, что в каждой хромосоме пшеницы много, тысячи генов. Но в диссертационной работе не исследовались ни промоторы, ни ингибиторы, ни гены с автономной функциональной активностью и сопряженным типом действия, обладающие и не обладающие одинаковой экспрессивностью. Исследование вышеперечисленных генов и влияния каждого из генов и каждого из классов генов на конъюгацию хромосом на современном уровне требует кропотливого цитогенетического и гибридологического анализа в сочетании с методами геномики, транскриптомики, иммунохимии – ничего этого в работе не было. Диссертант предполагает, что в каждой из моносомиков содержится все эти типы генов и потому моносомное состояние генов влияет на конъюгацию, но отсюда не следует, что диссертант УСТАНОВИЛ, что «большое количество генов» вышеперечисленных типов влияло на конъюгацию.

Вывод 3. «Изучение анафазы I у моносомных линий анализируемой серии показало, что характер поведения унивалента подчиняется механизмам мейотических процессов, имеющим место в нормальном эуплоидном генотипе». – сделанные диссертантом наблюдения не опровергают, но и не подтверждают этого умозаключения.

Вывод 4. «Способность унивалента с частотой 50% вести себя по типу редукционного деления показывает, что пусковым механизмом перехода хромосом от митоза к мейозу является смена полюсной ориентации центромер в зоне исходного полюса одного гаплоидного набора хромосом, в то время как второй гаплоидный набор сохраняет свою прежнюю биполярную (митотическую) ориентацию».

Вывод 4 не обоснован результатами работы. Из факта, что примерно 50% унивалентов расходятся к одному полюсу не следует, «что пусковым механизмом перехода хромосом от митоза к мейозу является смена полюсной ориентации центромер в зоне исходного полюса одного гаплоидного набора хромосом, в то время как второй гаплоидный набор сохраняет свою прежнюю биполярную (митотическую) ориентацию». Это лишь гипотеза. Гипотеза оригинальная, заслуживающая проверки, но не

исследованная в рамках данной работы. Если бы вывод 4 был сформулирован, как предложенная гипотеза, его можно было бы принять.

Вывод 5. «Проявление аполярного типа поведения унивалента в анафазе I свидетельствует о том, что после начала синапсиса хромосом те из гомологов, которые до сих пор сохраняли свою прежнюю митотическую ориентацию центромер, утрачивают свою связь с зоной исходного полюса и восстанавливают ее по завершению конъюгации, но не в прежнем митотическом порядке, а в последовательности, соответствующей редукционному делению».

Диссертант лишь наблюдал униваленты, не связанные нитями веретена ни с одним из полюсов, и посчитывал частоту их появлений в анафазе I в разных линиях. Все остальное – спекуляции, построенные на необоснованных экспериментальными данными предположений.

Вывод 6. «По результатам проведенного статистического анализа вариационного ряда частоты униполярного типа поведения унивалента в анафазе I и соответствующих графических построений установлено, что предотвращение синапсиса гомеологов у аллогексаплоидного вида пшеницы достигается путем пространственного их разведения и вмешательства генетического фактора, осуществляющего при полюсной ориентации центром в предмейотической интерфазе замену одного гомолога на другой. Сохранение пространственной изоляции гомеологов во время конъюгации обеспечивается тем обстоятельством, что синапсис хромосом проходит при фиксированном положении центромер одного гаплоидного набора»

– Проведенные автором расчеты индекса хи-квадрат при попарном сравнении частот случаев униполярного расхождения хромосом не привели и не могли привести к обоснованным представлениям о взаимном расположении хромосом у полюса в предмейотической интерфазе, об изоляции гомеологов во время конъюгации, о том, что центромеры одного из гомологов связаны с веретеном («фиксированы»), а другого нет.

Вывод 7 и вывод 8. Диссертант утверждает, что в мейозе у растений имеется 2 типа веретен «кинетическое веретено» и «веретено деления», причем веретена эти формируются независимо и в прометафазе I закономерно образуется «трехполюсное веретено» - такая интерпретация фактов не подтверждается многочисленными наблюдениями за

формированием веретена деления в норме в прометафазе у эуплоидных растений.

Вывод 10. «По данным цитологического анализа, хромосома 3D мягкой пшеницы обладает геном (генами), контролирующим связь кариокинеза и цитокинеза во времени и пространстве. Кроме того хромосома 3D определяет момент завершения кариокинеза и цитокинеза на заключительном этапе микроспорогенеза» - ЭТОТ ВЫВОД на том же самом материале уже защищен диссертантом в 1997 году в кандидатской диссертации.

Вывод 11 «На основании проведенного цитогенетического анализа мейоза у меж-видовых гибридов пшеницы было установлено, что синапсис хромосом сорта Омская 36 определяется геном, который по своей экспрессивности идентичен, но не аллелен базисному гену рода *Triticum*» – не обоснован, что означает выражение ген «по своей экспрессивности идентичен» базисному гену рода *Triticum* неясно, на аллелизм гипотетический ген с другими аллелями генов генома пшеницы, влияющими на синапсис, не проверялся.

Теперь обратимся к разделу «Научная новизна исследования» (стр. 7-8 диссертации и стр. 2-3 автореферата.

Диссертант пишет (стр. 7-8): «Впервые показано, что поведение хромосом в гемизиготном состоянии при редукционном делении клеток подчиняется общим механизмам мейотических процессов» – десятки людей, начиная с 1920-х годов, исследовали поведение хромосом у анеуплоидов в мейозе (напр.: Darlington, C.D. (1929). Meiosis in polyploids // J. Genet. 21(1):17-56). Кто из них писал, что поведение хромосом в гемизиготном состоянии при редукционном делении клеток НЕ подчиняется общим механизмам мейотических процессов ?

Стр. 8. Диссертант пишет: «Впервые предложен механизм перехода хромосом от митоза к мейозу. Показано, что пусковым механизмом данного процесса является коориентация центромер в зоне исходного полюса одного гаплоидного набора хромосом» - можно согласиться с диссертантом, его гипотеза о роли коориентации центромер у одного из полюсов в переходе от митоза к мейозу оригинальна. Однако говорить, что «впервые предложен механизм перехода хромосом от митоза к мейозу» нет никаких оснований.

Если говорить о генетическом контроле перехода от митоза к мейозу, то фундаментальное значение имеет открытие Родсом (Rhoades, 1956) гена кукурузы *Ameiotic1*, контролирующего переход от митоза к мейозу. Цитологические процессы у этого мутанта исследовал Palmer (1971), ген был выделен и клонирован в 2009 году (Pawlowski, W.P., Wang, C.J.R., Golubovskaya, I.N. et al. (2009) Maize AMEIOTIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis // PNAS USA 106(9): 3603-3608).

Что касается общих рассуждений о цитологических и молекулярных механизмах перехода от митоза к мейозу, то дискуссионность такого рода без малого 100 лет (Heys, F. (1931) The problem of the origin of germ cells // The Quarterly Review of Biology, 6(1), pp.1-45; Beach, D., Rodgers, L. and Gould, J. (1985) Ran1+ controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast // Current Genetics. 10(4): 297-311; Eckmann et al. (2004) GLD-3 and control of the mitosis/meiosis decision in the germline of *Caenorhabditis elegans*// Genetics. 168(1): 147-160 и др.).

Стр. 8. Диссертант пишет: «Впервые для мягкой пшеницы показано наличие в хромосоме 3D гена (генов) осуществляющего контроль над связью кариокинеза и цитокинеза во времени и пространстве». Сравним с выводом №7 диссертационной работы 1997 года: «Установлено, что хромосома 3D регулирует взаимосвязь цитокинеза с мейотическим аппаратом во времени и пространстве».

Автореферат отражает содержание диссертации.

Резюме: Диссертационная работа Николая Александровича Жаркова «ХАРАКТЕР ПРОЯВЛЕНИЯ МОНОСОМНОГО СОСТОЯНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЗЕ У TRITICUM AESTIVUM L. И ЕГО СВЯЗЬ С МЕХАНИЗМАМИ МЕЙОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.02.07 – Генетика является актуальным, оригинальным и трудоемким научным исследованием, однако большая часть выводов работы и часть положений, выносимых на защиту не обоснованы экспериментальным материалом, не обсуждены с привлечением данных из работ

предшественников, не доказаны с использованием иных аргументов, которые бы свидетельствовали в их пользу.

Обзор литературы сделан на основании источников, большая часть которых опубликована 17 и более лет назад, он недостаточно полно отражает современное состояние науки в избранной области исследований диссертанта.

Тем самым представленная к защите диссертация Н.А. Жаркова не соответствует критериям, установленным в «Положении о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а автор не заслуживает присвоения ему искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология и 03.02.07 – Генетика.

Заведующий лабораторией биосистематики и цитологии БИН РАН,
доктор биологических наук,
профессор

Александр Викентьевич Родионов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, дом 2,

тел./факс +7 (812) 372-54-43

avrodionov@binran.ru

26.04. 2018г.

