

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Глаголевой Анастасии Юрьевны

на тему:

«Идентификация и анализ генов биосинтеза меланина в колосе
ячменя (*Hordeum vulgare* L.)»,
представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.7. - генетика

Диссертационная работа Глаголевой А.Ю. посвящена актуальной теме - изучению генетического контроля биосинтеза фенольных соединений в зерновке ячменя. Фенольные соединения играют важную роль в росте и развитии растений, а также в их защите. Фенольные соединения обладают антиоксидантной активностью, делая накапливающие их пищевые культуры ценными компонентами питания человека. Объект исследования - ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) - является одной из наиболее широко возделываемых зерновых культур в мире и широко используется в качестве компонента рациона питания человека, кормовой культуры и сырья для пивоваренной промышленности.

Диссертация Глаголевой А.Ю. построена по стандартному для кандидатских диссертаций плану и включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа изложена на 147 страницах, содержит 16 рисунков, 5 таблиц и 8 приложений.

Обзор литературы содержит современные данные по типам пигментов у растений и их биосинтезу. Поскольку тема диссертации связана с биосинтезом растительных меланинов, особое внимание уделяется этой группе пигментов – несмотря на то, что данных о путях их биосинтеза к настоящему времени накоплено немного. Отдельный раздел обзора посвящен ферментам полифеноксидазам, участвующим в биосинтезе меланина, выявление и изучение которых у ячменя также входило в задачи работы. Обзор литературы написан подробно, доступным языком, хорошо проиллюстрирован, содержит небольшое заключение, суммирующее данные по представленной теме. Эта часть диссертации, а также список литературы, который включает в себя 173 источника, из них 170 - на английском языке, отражают отличное знакомство автора с изучаемой темой. Особо следует отметить, что Глаголева А.Ю. также является автором самого последнего обзора по растительным меланинам, опубликованного в 2020 году во *Frontiers in Plant Science*.

Раздел «Материалы и методы» также написан очень подробно, подтверждает разнообразие использованных методов и хорошее владение диссертантом современным арсеналом приборов и методик: от генетического анализа и качественного определения пигментов в растительных экстрактах до количественного анализа экспрессии генов и анализа последовательностей ДНК *in silico*.

Раздел «Результаты» отражает как большой объем проделанной работы (к примеру, генотипирование нескольких сотен образцов генетической коллекции ячменя по ПЦР-маркерам локуса *Vlp1*), так и высокую результативность. Анастасии Юрьевне впервые удалось выявить наиболее вероятный кандидат на роль гена *Vlp1*, моногенно

контролирующего синтез меланина в цветковых чешуях и перикарпе ячменя. Интересно, что этот ген кодирует CLE-пептид – представитель семейства пептидных фитогормонов, которые играют огромную роль в развитии растений, но роль которых в синтезе пигментов и меланина в частности, ранее не была задокументирована. Автором также выявлены два новых гена в контроле пути биосинтеза фенилпропаноидов и генов полифенолоксидаз у растений на разных стадиях развития и в разных органах, в том числе в колосе. Согласно полученным автором данным, экспрессия одного из них - гена *Pro2* специфично активируется только в линии с меланином в зерновке. Согласно этим данным и данным генетического анализа, автором была выдвинута гипотеза о специфической активации экспрессии гена *Pro2* продуктом гена *Blp1*.

Результаты, полученные в данной диссертации, имеют высокую теоретическую и практическую значимость. Во-первых, получены новые данные о генетической регуляции биосинтеза меланина у растений, в том числе – о роли одного из пептидов CLE в регуляции этого пути. Во-вторых, разработанные автором ПЦР-маркеры к гену *Blp1* могут быть использованы для эффективного маркер-контролируемого отбора генотипов ячменя с меланином в зерне.

В то же время к рассматриваемой диссертационной работе можно высказать несколько незначительных замечаний и пожеланий.

1. Относительно гена, кодирующего пептид CLE, который был выявлен в качестве кандидата на роль гена *Blp1*:

Имеется ряд неточных формулировок, видимо, связанных с недостаточным владением автором информацией о механизмах действия пептидов этой группы. К примеру, в диссертации и автореферате встречаются такие фразы как «выделенный ген-кандидат относится к семейству CLE-генов, которые участвуют в дифференцировке клеток меристем и органогенезе растений (Ni and Clark, 2006). Данный ген представляет собой **трансмембранный пептид**» или «и содержит N-концевой сигнальный пептид, содержащий 27 аминокислот, а также участок пептида с 28 по 88 а.о. **является областью, локализованной во внеклеточном пространстве во время закрепления пептида на мембране**». Здесь следует отметить, что пептиды CLE локализуются на мембране только при связывании со своими рецепторами, а сами не являются трансмембранными белками. То, что для данного гена были выявлены термины GO, связанные с его клеточной локализацией типа GO:0016021, GO:0016020) - интегрированный компонент клеточной мембраны и относится к его связыванию с трансмембранными рецепторами (согласно принадлежности его же к GO:0033612, он как раз участвует в связывании с рецепторными серин/треониновыми киназами).

К этой же части также имеются вопросы:

- Что известно о пептидах CLE ячменя и других злаков? На какой из известных CLE похож выявленный вами ген-кандидат? Относительно выявленных автором генов полифенолоксидаз приведено филогенетическое древо для генов этого семейства у злаков (рис. 13). Возможно, составление такого же для генов *CLE* помогло бы что-то предположить относительно функции выявленного гена.
- Относительно выявленных полиморфных сайтов в этом гене *CLE*. Автор пишет, что обе замены в белок-кодирующей области являются несинонимичными и приводят к замене аминокислот. На какие домены пептида приходятся эти

замены? Это очень важно для предположений относительно их возможной роли в работе пептида.

2. В работе имеется ряд терминологических недочетов связанных с не совсем корректным использованием терминов «ген» и «белковый продукт гена», например: «все четыре гена обладают функциональным тирозиназным доменом, включающим два консервативных Си-связывающих мотив» или «четыре гена обладают сходной третичной структурой белка».

3. Замечание к представлению данных количественного анализа экспрессии генов: на рисунках 10, 11, 14 отсутствует обозначение оси ординат. Кроме того, диапазоны шкал разные, и шкалы содержат разделения 0.01 – 0.05 и т.д., но нигде нет единицы. Это не совсем верно, обычно какая-то проба принимается за условную единицу (калибратор) и относительно нее оцениваются уровни экспрессии в прочих пробах. Кроме того, ни в тексте, ни в подписях к рисункам не сказано, приведены данные по одной характерной биологической повторности – или же усредненные данные по всем трем.

4. Небольшое замечание к данным генетического анализа. Автор пишет, что в результате генотипирования растений гибридных популяций при помощи ПЦР-маркеров к генам *Vlp1* и *Ppo2*, было установлено, какие фенотипы растений (черный и серый) ассоциированы с доминантными или рецессивными аллелями изучаемых генов. Что насчет белых растений? Мне кажется, что данные по их генотипированию нужно также привести хотя бы для полноты картины. Кроме того, на рисунке необходимо привести предполагаемую схему взаимодействия продуктов генов *Vlp1* и *Ppo2*. В результате это будет не только полная картина, но и, скажем, прекрасная «авторская» генетическая задача для студентов, где будут сочетаться фенотипический анализ и генотипирование методом ПЦР.

Следует отметить, что вышеприведенные замечания не влияют на ценность и актуальность работы, а также не умаляют качество полученных автором результатов.

По актуальности, объёму проведенных исследований, научно-методическому уровню, новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует критериям п. 9, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Глаголева Анастасия Юрьевна заслуживает присуждения ей искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. - генетика.

Официальный оппонент

Лутова Людмила Алексеевна
профессор кафедры генетики и биотехнологии
Санкт-Петербургского государственного университета,
доктор биологических наук
по специальности 03.00.15 генетика

Адрес: 199034, Санкт-Петербург,
Университетская набережная д. 7/9
Санкт-Петербургский государственный университет

