



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВНИИСБ

Г.И. Карлов

«17» января 2023 г.

Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу

Глаголевой Анастасии Юрьевны на тему:

«ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА МЕЛАНИНА

В КОЛОСЕ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*)»,

представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика

(биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

Определение генетической основы фенотипических признаков – фундаментальная задача биологии. Выявление функции генов необходимо для понимания механизма формирования ценных признаков. Представленная работа расширяет понимание генетики метаболизма пигмента меланина и предшественников пигментов фенилпропаноидов в ячмене.

Ячмень – одна из широко распространенных сельскохозяйственных культур, выращиваемых как кормовая культура и как культура для производства солода и круп. Имеются указания, что ячмень, содержащий в зерновке меланин, более устойчив к фузариозу. Также, наличие меланина в зерне делает ячмень привлекательным в качестве “функциональной еды” – продукта, обладающего дополнительным полезным действием на организм. В

настоящее время генетика метаболизма меланина и других пигментов активно изучается, и данная работа безусловно является актуальной.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации

Научная новизна работы заключается в том, что выявлены новые гены, участвующие в метаболизме фенольных пигментов, а также новые связи между ними. Прежде всего, внутри локуса протяженностью 0,8 Мб впервые выявлен ген-кандидат *Blp-1* (*Black lemma and pericarp 1*) и его аллельные варианты, определяющие наличие или отсутствие синтеза меланина в зерновке ячменя. *In silico* анализ этого гена показал, что он кодирует сигнальный пептид. Также, с помощью *in silico* анализа впервые выявлены два новых гена-кандидата полифенолоксидаз *Ppo3* и *Ppo4*, и получены данные, согласно которым в синтезе меланина в зерновке ячменя участвуют, вероятно, только известные ранее гены *Ppo1* и *Ppo2*. Также впервые показано, что доминантный аллель *Blp-1* ассоциирован с повышенной активностью экспрессии ряда ферментов синтеза фенилпропаноидов на поздних стадиях созревания колоса. Таким образом, полученные результаты расширили понимание генетики синтеза меланина и фенилпропаноидов в зерновках ячменя.

Достоверность результатов исследования

Полученные Глаголевой А. Ю. научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Это обусловлено адекватностью выбранных методических подходов, правильностью использования этих методов, достаточным числом растений для ассоциативного картирования. Все выводы, которые этого требуют, сделаны на основе результатов статистической

обработки результатов исследования. Работа выполнена на современном методическом уровне.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Научно-практическая значимость работы не вызывает сомнений, так как удалось выявить гены, отвечающие за биосинтез меланина, в частности ключевого регулятора этого биосинтеза гена *Blp-1* и его активную и неактивную аллельные формы. Разработанные маркеры для определения аллеля *Blp-1* позволяют использовать результаты исследования непосредственно на практике для селекции меланин-синтезирующих линий и сортов растений. При этом несколько сотен образцов ячменя коллекции ВИР и ИЦиГ СО РАН в ходе работы были генотипированы. Также, учитывая связь между аллелем *Blp-1* и экспрессией генов синтеза фенолпропаноидов, являющихся предшественниками флавоноидов и других метаболитов, результаты данной работы могут быть полезны для исследований синтеза других пигментов и селекции по ним. Полученные знания позволяют приблизиться к созданию растений с оптимальным содержанием тех или иных пигментов для повышения их потребительских свойств и устойчивости к стрессам.

Общая характеристика работы

Рукопись диссертации изложена на 147 страницах, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и содержит заключение и выводы. Список литературы включает 173 ссылки в основном на англоязычные публикации.

Иллюстративный материал содержит 5 таблиц и 16 рисунков в основных частях диссертации, а также 3 таблицы и 5 рисунков в приложении.

Обзор литературы объемом 37 страниц посвящён описанию генетики, путей синтеза и их регуляции для двух типов растительных пигментов фенольной природы. Это, во-первых, флавоноиды, синтез которых изучен лучше, но в работе они затронуты в меньшей степени, и, во-вторых, меланины, генетика синтеза которых находится в фокусе данной работы. В обзоре описываются свойства растительного меланина, функции меланина в растениях, наличие меланина в разновидностях ячменя, имеющиеся данные по картированию локуса, определяющего синтез меланина, связь этого локуса с синтезом других фенольных пигментов, гены полифенилоксидаз, участвующие в синтезе меланина. Обзор написан информативно и без лишних деталей, можно лишь отметить, что глава о взаимодействии меланина с хлорофиллом, хотя и интересна, но представляется небольшим экскурсом в сторону от основного изложения, хотя логика появления этой главы понятна – рассмотрено предположение о возможном участии хлорофилла и пластид в биосинтезе растительного меланина.

Раздел Материалы и методы кратко, на 7 страницах, но содержательно описывает растительный материал и использованные методы. Можно отметить большой диапазон методов – от работ по скрещиванию, секвенированию, разработке маркеров для генотипирования и количественной ПЦР до *in silico* анализа последовательностей и моделирования 3Д структуры белка, применяя инструменты, доступные в интернете.

Раздел Результаты составляет 29 страницы и дополняется 23 страницами таблиц и картинок в Приложении и подробно описывает полученные данные. Изложение построено так, что понятна логика исследования, и из полученных результатов органично вытекает последующее Обсуждение на 12 страницах.

В целом диссертационное исследование Глаголевой А.Ю. заслуживает положительной оценки, так как выполнена большая по объему, трудоемкая, грамотно в научном смысле построенная работа, завершенная важными в научном и практическом отношении результатами.

Апробация результатов работы

Материалы работы были представлены на одиннадцати международных и российских научных конференциях с публикацией тезисов на 8 конференциях.

По результатам исследований опубликованы 3 работы в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ, из которых две статьи - в журнале *Frontiers in Plant Science* (Q1 в области Plant Science по данным JCR, Impact Factor 6.63) и одна - в журнале *Agronomy* издательства MDPI (Q1 в области Agronomy по данным JCR, Impact Factor 4.12).

Рекомендации по использованию результатов работы

Полученные в диссертационном исследовании результаты могут быть рекомендованы для применения в практической работе для анализа аллельного состояния ключевого регулятора биосинтеза меланина *Vlp-1*. Кроме того, данные результаты имеют ценность для дисциплин «Генетика» и «Биохимия».

Вопросы к работе и замечания

При несомненном высоком качестве и значимости диссертационной работы Глаголевой А.Ю., при чтении диссертации возникло несколько вопросов и замечаний:

1. Определение меланинов в зерновках проводилось качественно. Для более аккуратной оценки присутствия меланинов и различения меланинов от антоцианов проводились экстракции в двух условиях, одном - оптимальном для экстракции меланинов, и другом – для экстракции антоцианов. По картинке в Приложении 3 цвет образца ВА без меланина ненамного светлее, чем цвет образца ВLP с меланином. Не наблюдался ли непрерывный диапазон окрашивания меланином от нулевого значения к максимальному через плавную градацию менее и более окрашенных экстрактов? Почему не проводилось определение численных значений оптической плотности экстрактов на спектрофотометре?

2. В диссертации не описано как проводилась разработка последовательностей праймеров для количественной ПЦР для определения суммарной экспрессии генов биосинтеза фенилпропаноидов и полифенолоксидаз. Проводилась ли она самостоятельно? Проверялись ли полученные пары праймеров на эффективность амплификации с помощью разбавления кДНК в широком диапазоне?

3. В Методах в разделе ПЦР в реальном времени написано, что экспрессия актина была использована как внешний контроль. На самом деле экспрессия генов домашнего хозяйства (housekeeping genes) – это внутренний контроль, поскольку транскрипты этих генов изначально присутствуют в образцах выделенной РНК, а не добавляются извне. Также, ссылка на последовательности праймеров для актина (von Zitzewitz et al., 2005) не была найдена в Списке литературы.

4. Также, в разделе ПЦР в реальном времени написано, что подсчет относительного уровня экспрессии проводился методом dCt. Правильное обозначение этого метода – ddCt, поскольку в расчете участвуют две разницы в “threshold cycle” – для определяемого гена и для гена нормализации (в данном случае актина).

5. В диссертации при анализе результатов количественного ПЦР полученные значения интерпретируются как абсолютные значения уровня экспрессии транскриптов генов. Например, на стр. 68 написано: "... причем наибольший уровень экспрессии наблюдается в корнях на стадии проростков (Рисунок 10)". Однако, значения, получаемые методом ddCt и представленные на Рисунке 10 – это относительный уровень экспрессии интересующего гена, нормализованный по гену домашнего хозяйства (ГДХ). При сравнительно равном уровне транскриптов ГДХ в одинаковых тканях на одинаковых стадиях развития, уровень этих транскриптов может сильно отличаться в различных тканях. Это не отменяет выводы, сделанные в данном исследовании на основе ПЦР в реальном времени, поскольку они были основаны на сравнении уровня экспрессии генов в одинаковых тканях на одинаковых стадиях развития. Однако общая интерпретация результатов ПЦР в реальном времени должна быть более сдержанная, и чтобы процитированное утверждение делать более обоснованным, как минимум необходимо использовать несколько разных ГДХ.

6. В диссертации не приведены картинки с примерами результатов ПЦР-генотипирования. Есть ли такие картинки в опубликованных статьях?

7. Во Введении пишется, что меланины "представляют собой плотные, химически инертные соединения". Далее, пишется, что меланин обладает антиоксидантными свойствами. Действительно, меланины обладают антиоксидантными свойствами, то есть способностью реагировать с активными формами кислорода или азота, перекисью водорода и прочими оксидантами с более высокой скоростью, чем другие органические компоненты растения. Таким образом, меланины не могут быть названы инертными соединениями.

8. Стилистическое замечание 1. В выводе 4 используется выражение "выделили ген". Представляется более подходящим выражение "выявили ген".

9. Стилистическое замечание 2. При описании роста уровня транскриптов генов биосинтеза фенилпропаноидов на поздних стадиях созревания колоса при наличии доминантного аллеля *Vlp-1* используется выражение “вторичная активация”. Слово “вторичное” часто используется не как указание на повторение (например, “вторичные метаболиты”) Представляется более подходящим выражение “повторная активация”.

10. На страницах 55-56 не верно указана ссылка на таблицу с характеристиками праймеров – они не в Таблице 1, а в Приложении 2.

Заключение

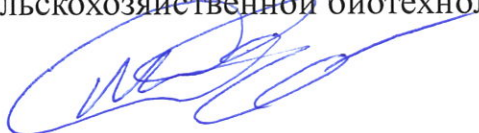
Диссертационная работа Глаголевой Анастасии Юрьевны на тему: «ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АНАЛИЗ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА МЕЛАНИНА В КОЛОСЕ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*)», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика (биологические науки), является законченной научно-квалификационной работой.

По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335), а ее автор Глаголева Анастасия Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Глаголевой А.Ю. подготовлен к.б.н. Литвиновым Д.Ю., обсужден и утвержден на заседании лаборатории

прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений от 17 января 2023 года (протокол № 3).

Кандидат биологических наук по специальности
03.00.15 – генетика (биологические науки),
заведующий лаборатории
прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»



Дивашук Михаил Георгиевич

Кандидат биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки),
старший научный сотрудник лаборатории
прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»



Литвинов Дмитрий Юрьевич

Подпись Дивашука М.Г. и Литвинова Д.Ю. : заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ
«17» января 2023 г.

Е.И. Федина

127550 Москва, улица Тимирязевская, дом 42
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ).
Телефон: +7 4959766544. E-mail: iab@iab.ac.ru