

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова
И.о. директора, д.б.н.  А.В. Мисюрин

06 февраля 2024 г.



ОТЗЫВ

Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук на диссертационную работу ШМАКОВА Николая Александровича тему: «ПОИСК ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ И МЕЛАНИЗМОМ У ЯЧМЕНЯ *HORDEUM VULGARE* L., НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.8. «Математическая биология, биоинформатика» и 1.5.7 – «Генетика» в диссертационный совет 24.1.239.01, созданный на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН».

Актуальность исследования

Исследование растительных пигментов, которые придают окраску различным органам растений, а также их влияние на транскриптом и метаболизм растений имеет значительную актуальность. Хлорофиллы, пигменты, участвующие в фотосинтезе, и меланины, отвечающие за черную окраску органов растений, являются объектами активного изучения. Мутации в генах биосинтеза этих пигментов, проявляющиеся, например, в альбинизме у ячменя, представляют интерес для понимания молекулярных механизмов их влияние на транскриптом и метаболизм растений. Гены *Alm* и *Blp*, ответственные за альбинизм и черную окраску соответственно, являются потенциальными моделями для исследования метаболических и генных сетей растений. Исследование Шмакова Николая Александровича является весьма весомым вкладом в идентификацию генов, ассоциированных с частичным альбинизмом и меланизмом у ячменя *Hordeum vulgare*.

Научная новизна

Шмаков Николай Александрович впервые провел транскриптомный анализ почти изогенных линий ячменя, различающихся по окраске колоса. Были выявлены гены,

понижающие экспрессию в лемме ячменя линии *i:BwAlm*, связанные с аэробным и фотодыханием, а также повышающие экспрессию – связанные с протеолизом и защитным ответом в линии с альбинизмом и метаболизмом жирных кислот, фенольных соединений и полихинонов в линии с меланизмом. Был открыт новый транскрипт, кодирующий белок с доменами прохибитина. Использование нескольких методов биоинформатической обработки данных RNA-seq повысило точность и чувствительность в определении дифференциальной экспрессии генов, а объединение сборок транскриптома улучшило определение последовательностей транскриптов.

Практическая и теоретическая значимость работы

Это исследование демонстрирует значимость использования множественных методов обработки данных RNA-seq для повышения точности оценок дифференциальной экспрессии генов и структуры транскриптов. Проведенная работа позволила выявить изменения в экспрессии генов у ячменя с альбинизмом и меланизмом, указывая на их связь с различными метаболическими путями, такими как защитный ответ, протеолиз и метаболизм жирных кислот. Открытие новых транскриптов, включая те, которые кодируют пептиды с доменами прохибитина, предоставляет новые перспективы для понимания генетического контроля синтеза пигментов и создания улучшенных сортов растений в сельском хозяйстве.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа ШМАКОВА Николая Александровича тему: «ПОИСК ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ И МЕЛЕНИЗМОМ У ЯЧМЕНЯ *HORDEUM VULGARE L.*, НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ» выполнена на 159 страницах, иллюстрирована 22 рисунками и содержит 18 таблицы, а также 4 таблицы в приложении. Библиографический указатель состоит из 390 источников. Работа построена по традиционной схеме с состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения.

В разделе «Введение» автором описана основная проблематика исследования, обоснована актуальность проводимых исследований, сформулированы цель и задачи. Также отражено личное участие автора и приведена информация о теоретической и практической значимости работы, приведены положения, выносимые на защиту, отражены публикации и апробации работы.

«Обзор литературы» является компетентным введением в экспериментальную часть.

В нем детально рассмотрена информация о ячмене как экономически значимой культуры, приводится характеристика его генома, история его секвенирования и особенности разных сборок генома. Вторая часть обзора литературы посвящена альбинизму и меланизму растений. Здесь рассматриваются вопросы точной координации экспрессии генов пластида и ядра для достижения стехиометрического равновесия белков, участвующих в фотосинтезе, описываются различные стадии биосинтеза хлорофилла обсуждается важность механизмов развития пластид, синтеза хлорофилла и хлорофилл-связывающих белков для жизни растений и всей биосферы. В конце упоминается использование мутантов с нарушениями синтеза хлорофилла для исследования этих процессов. Также рассматриваются другие растительные пигменты и их разнообразные функции, сосредотачиваясь на меланинах как одном из классов пигментов. Рассматривается структура и роль меланинов в растениях, включая их влияние на защиту от внешних стрессов, а также практическое применение в промышленности. Обсуждаются механизмы синтеза меланинов и их локализация в растительной клетке, а также возможные генетические механизмы, регулирующие этот процесс. Третья часть обзора литературы посвящена методам транскриптомных исследований и методам массивного параллельного секвенирования.

В разделе «Материалы и методы» диссертант с исчерпывающей полнотой описывает методы, использованные при выполнении данной работы. Эта внушительная методическая часть характеризует автора как зрелого исследователя, способного эффективно использовать большой арсенал современных биоинформатических методов. Использованные автором методы современны и адекватны поставленным задачам.

Структура разделов «Результаты» и «Обсуждение» соответствует задачам, поставленным для достижения главной цели исследования. Раздел «Результаты» включает два подраздела. В первом представлены результаты анализа транскриптома почти изогенной линии ячменя i:BwAlm в сравнении с Bowman. Во втором анализ транскриптома почти изогенной линии ячменя i:BwVlp в сравнении с Bowman. Оба раздела имеют схожую структуру: сначала описывается процесс предварительной обработки библиотек коротких прочтений, включая шаги фильтрации, удаления адаптеров и качественного контроля данных. Далее рассматривается процесс картирования коротких прочтений с референсным геномом. Следующая часть посвящена выявлению генов, чей уровень экспрессии значительно различается между образцами, что может свидетельствовать о их важной роли в различных биологических процессах, после чего проводится анализ генных онтологий и метаболических путей, используемых для описания связей между генами и их функциями, с целью лучшего понимания биологических процессов. Далее рассматривается экспрессия

генов пластома и генов в районе Alm и Vlp, после чего приводятся результаты реконструкции транскриптома *de novo*.

В разделе «Обсуждение» диссертант анализирует полученные результаты в контексте известных к настоящему моменту мировых подходов к обработке данных RNA-seq, в том числе оценке качества библиотек, сравнении конвейеров биоинформатической обработки данных и конвейеров *de novo* реконструкции транскриптома. Также в данном разделе автор обсуждает полученные результаты сравнительного анализа транскриптомов в лемме ячменя линии i:BwAlm, характеризующейся частичным альбинизмом, почти изогенной линии i:BwVlp, характеризующейся меланизмом колоса по сравнению с сортом Bowman.

В «Заключении» подводятся итог работы. Представленные выводы диссертации и основные положения, выносимые на защиту, обоснованы, логичны, соответствуют поставленным задачам, в полной мере отражают результат диссертационной работы.

Замечания

Однако к диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В обзоре литературы в разделе «1.6.1 Платформы для секвенирования второго поколения» приводится анализ различных платформ секвенирования, в том числе уже не используемых, таких как Roche 454 или SOLiD. Хорошо, что автор знает эти технологии, но они не имеют особого отношения к работе и информация о них здесь избыточна.
2. В разделе «1.6.2 Ход эксперимента RNA-seq» Обзора литературы, автор говорит, что «Поскольку обработка и анализ экспериментальных данных RNA-seq требуют больших временных затрат, а само проведение эксперимента - материальных вложений, большой важностью обладает стадия планирования эксперимента», после чего рассказывает о всех возможных и необходимых шагах при транскриптомном анализе, однако не касается вопроса использования UMI (Unique Molecular Identifiers), уникальных молекулярных идентификаторов, позволяющих существенно повысить точность транскриптомного анализа.
3. В разделе Материалы и методы на стр. 60 автор говорит, что «Тотальная РНК, выделенная из нескольких растений, была объединена для получения каждого из биологических образцов.». При этом, какое количество скрывается за фразой «нескольких» имеет весьма принципиальное значение – это два растения или 10? Или 50? Одинаковое количество растений использовано в разных биологических повторностях или нет?

4. Тотальную РНК выделяли из цветковой чешуи (леммы), после чего проводили транскриптомный анализ. Почему не было проведено сравнительного транскриптомного анализа тех же линий, но в органах растений, не имеющих соответствующих фенотипических проявлений, например листьях? Не было бы в них выявлено изменений экспрессии тех же генов (или генов, участвующих в тех же процессах, изменения в которых были выявлены), что и в тканях леммы?
5. С моей точки зрения, выводы 1 и 2 дополняют друг друга и могут быть объединены в один.
6. Количество полученных прочтений для библиотек достаточно скромное (например, таблица 3), надо стремиться к 30 млн прочтений на библиотеку, что позволяет достоверно анализировать изменение экспрессии порядка 70% генов. Данное замечание не ставит под сомнение достоверность полученных результатов.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки представленной работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации соответствует установленным требованиям и отражает основные результаты проведенных исследований. В автореферате отражены актуальность исследования, степень разработанности темы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, и полученные результаты.

Сведения о полноте опубликованных работ

Результаты исследования полностью представлены в 4 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата биологических наук. В опубликованных научных работах и автореферате полностью отражены основные результаты диссертации, положения и выводы.

Заключение

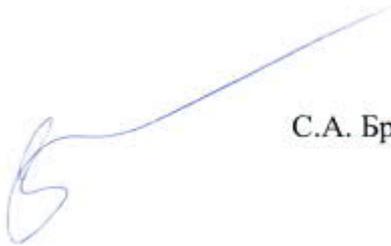
Диссертационная работа Шмакова Николая Александровича тему: «ПОИСК ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ И МЕЛАНИЗМОМ У ЯЧМЕНЯ *HORDEUM VULGARE* L., НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ», выполненная под руководством кандидата биологических наук, доцента Афонникова Дмитрия Аркадьевича и доктора биологических наук, профессора РАН,

Хлесткиной Елены Константиновны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для генетики растений. Таким образом, диссертационная работа Шмакова Н.А. на тему: «ПОИСК ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЧАСТИЧНЫМ АЛЬБИНИЗМОМ И МЕЛАНИЗМОМ У ЯЧМЕНЯ *HORDEUM VULGARE* L., НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ТРАНСКРИПТОМНЫХ ДАННЫХ», соответствует требованиям пп. 9 - 14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями от 28.08.2017 г. №1024, 01.10.2018 №1168 и от 11.09.2021 №1539 предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.8. «Математическая биология, биоинформатика» и 1.5.7 – «Генетика».

Отзыв ведущей организации рассмотрен на заседании Отдела генной инженерии и синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (протокол №1 от 01 февраля 2024 г.).

Отзыв подготовил:

заведующий лабораторией функциональной геномики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук,
кандидат биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология, доцент


С.А. Брускин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3
Сайт www.vigg.ru
Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62
Email: iogen@vigg.ru

Подпись Брускина С.А. заверяю,
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики имени Н.И. Вавилова,
д.б.н.
«06» февраля 2024г.


И.И. Горячева