

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 21 февраля 2024 г. № 2

О присуждении Шмакову Николаю Александровичу
(гражданин РФ)

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Шмакова Н.А. «Поиск генов, ассоциированных с частичным альбинизмом и меланизмом у ячменя *Hordeum vulgare* L., на основе анализа транскриптомных данных», по специальностям 1.5.8.- математическая биология, биоинформатика и 1.5.7.- генетика, принята к защите 22.11.2023 г, протокол № 37, Диссертационным советом 24.1.239.01 (Д 003.011.01), созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Шмаков Николай Александрович, 11 мая 1990 года рождения, в 2012 году окончил Факультет естественных наук Новосибирского государственного университета с присуждением степени

специалиста по направлению подготовки «06.04.01 Биология». В 2014 году окончил инженеринговую магистратуру НГУ с присуждением степени магистра по направлению подготовки «06.04.01 Биология». В 2018 году окончил очную аспирантуру ИЦиГ СО РАН по направлению подготовки «06.06.01 Биологические науки». В настоящее время работает младшим научным сотрудником в Секторе биоинформатики и информационных технологий в генетике ИЦиГ СО РАН.

Диссертация выполнена в Лаборатории эволюционной биоинформатики и теоретической генетики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Научные руководители – кандидат биологических наук Афонников Дмитрий Аркадьевич, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией эволюционной биоинформатики и теоретической генетики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, и доктор биологических наук Елена Константиновна Хлёткина, директор Федерального исследовательского центра «Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург.

Официальные оппоненты:

1. **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы функциональной геномики ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва
2. **Касьянов Артём Сергеевич**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории №19 ФГБУН Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, г. Москва

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, г. Москва, в своём положительном отзыве, составленном кандидатом биологических наук, заведующим лабораторией функциональной геномики ИОГен РАН Брускиным Сергеем Александровичем и утвержденном и.о. директора ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова доктором биологических наук Мисюриным А.В. указывает, что «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 присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.8. «Математическая биология, биоинформатика» и 1.5.7 – «Генетика». Отзыв рассмотрен на заседании Отдела генной инженерии и синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (протокол №1 от 01 февраля 2024 г.)».

Соискатель имеет всего 26 опубликованных работ, из них по теме диссертации 10, общим объемом 42 страницы, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (WoS, Scopus) и 6 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций. Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные публикации по теме диссертации:

1. Шмаков Н.А. Улучшение качества сборки de novo транскриптомов ячменя на основе гибридного подхода для линий с изменениями окраски колоса и стебля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021;25(1):30-38. DOI 10.18699/VJ21.004 (РИНЦ, Scopus. IF: 0,22)
2. Glagoleva A.Y., Shmakov N.A., Shoeva O.Y., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Börner A., Afonnikov D.A., Khlestkina E.K. Metabolic pathways and genes identified by RNA-seq analysis of barley near-isogenic lines differing by allelic state of the Black lemma and pericarp (Blp) gene. BMC Plant Biology. 2017; 17 (Suppl 1):182. doi: 10.1186/s12870-017-1124-1. (Scopus, WoS, РИНЦ. IF: 5,3)
3. Shmakov N.A., Vasiliev G.V., Shatskaya N.V., Doroshkov A.V., Gordeeva E.I., Afonnikov D.A. and Khlestkina E.K. Identification of nuclear genes controlling chlorophyll synthesis in barley by RNA-seq. BMC Plant Biology. 2016. 16 (Suppl 3):245. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0926-x>. (РИНЦ, Scopus, WoS. IF: 5,3)

На диссертацию и автореферат поступило 4 отзыва, все положительные. Отзывы прислали:

1. Давоян Эдвард Румикович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии ФГБНУ “Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко”, г. Сочи
2. Афанасенко Ольга Сильвестровна, доктор биологических наук, профессор, академик РАН, заведующая лабораторией иммунитета растений к болезням ФГБНУ “Всероссийский институт защиты растений”, г. Санкт-Петербург
3. Землянская Елена Васильевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Сектора системной биологии морфогенеза растений ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск

4. Цепилов Яков Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории Рекомбинационного и Сегрегационного Анализа ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оба оппонента являются компетентными специалистами в области генетики растений и/или биоинформатики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих учреждений в области генетики и биоинформатики, что позволяет произвести экспертную оценку полученных в диссертационной работе результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований предложен метод оптимизации вычислительного конвейера для биоинформатической обработки данных массового высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-seq), повышающий точность оценки дифференциальной активности генов, примененный для обработки транскриптомных библиотек ячменя.

Доказано, что транскриптомы двух почти изогенных линий ячменя, несущих мутации в генах *Alm* и *Blp* и контрастных по степени пигментации колоса, отличаются от родительской линии не только по уровню активности генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза хлорофилла у линии ячменя с частичным альбинизмом (мутация гена *Alm*), и генов ферментов, участвующих в биосинтезе фенилпропаноидов у линии ячменя с частичным меланизмом (мутация гена *Blp*), но и генов, связанных с процессами фотосинтеза, фотодыхания и ассимиляции азота.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что впервые, с помощью разработанного метода оптимизации обработки данных RNA-seq, проведен сравнительный анализ транскриптомов почти изогенных линий

ячменя *i:BwAlm* и *i:BwBlp*, контрастных по окраске колоса, который позволил выявить гены и процессы, ассоциированные с формированием частичного альбинизма и меланизма.

Показано, что формирование дефицита хлорофилла в развивающихся колосках растений ячменя мутантной линии *i:BwAlm* сопровождается понижением уровня транскрипции генов ферментов, участвующих в процессах биосинтеза хлорофилла, фотосинтеза, фотодыхания, аэробного дыхания и ассимиляции азота, а также повышением активности генов, вовлеченных в протеолиз и ответ на стресс. Показано также, что в транскриптоме оболочки зерновки линии *i:BwAlm* присутствует транскрипт гена, кодирующего белок с доменом прохибитина, не обнаруженный в транскриптоме сорта Bowman.

Показано, что формирование меланиновой окраски в лемме ячменя линии *i:BwBlp* сопровождается не только повышением уровня экспрессии генов ферментов, участвующих в синтезе фенольных соединений и *o*-дихинонов, но и понижением экспрессии генов ферментов, связанных с фотосинтезом, фотодыханием и ассимиляцией азота.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан алгоритм сравнения конвейеров биоинформатической обработки данных, полученных в результате массового секвенирования РНК на основе платформ второго поколения, позволяющий подобрать оптимальный комплекс программ для обработки конкретных транскриптомных библиотек и повысить, благодаря этому, эффективность выявления дифференциально экспрессирующихся генов.

Полученные в диссертационной работе данные и разработанный метод обработки транскриптомных данных представляет интерес для научных учреждений биологического и сельскохозяйственного профиля, связанных с изучением молекулярно-генетических механизмов контроля синтеза растительных пигментов, в том числе у злаковых с частичным альбинизмом

или меланизмом колоса, а также в образовательном процессе при чтении курсов лекций по биоинформатике и генетике растений.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы биоинформатические программы для обработки данных RNA-seq путём картирования библиотек коротких прочтений на референсный геном и реконструкции транскриптома *de novo*. Для формирования конвейеров биоинформатической обработки, анализа полученных данных и создания иллюстраций использованы технологии программирования на языках bash, Perl, Python и R. Для статистической обработки данных использованы точный тест Фишера, тест отношения правдоподобия, гипергеометрический тест, методы поправки на множественное сравнение, а также анализ линейных зависимостей и анализ главных компонент. Для функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов использованы программный пакет BLAST, базы данных последовательностей NCBI, терминов Генной Онтологии (GO) и онлайн-сервис Singular Enrichment Analysis (SEA), реализованный в интерфейсе базы данных AgriGO v.2. Для оценки представленности генов в метаболических путях использована база данных PlantCyc v.3.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается верификацией данных по дифференциальной экспрессии ряда генов с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием обратной транскриптазы. Для сравнения результатов анализа RNA-seq и экспериментальной верификации с помощью ПЦР использован коэффициент корреляции Пирсона. Наличие нового транскрипта, обнаруженного в транскриптоме линии i:BwAlm, и его отсутствие в транскриптоме линии Bowman подтверждено независимой экспериментальной проверкой.

Личный вклад автора заключается в разработке метода выявления дифференциально экспрессирующихся генов на основе формирования вычислительных конвейеров обработки данных RNA-seq и выбора

конвейера с наилучшей конфигурацией на основе оценки мер качества, а также в непосредственном участии в поиске ранее не аннотированных транскриптов ячменя, функциональной аннотации дифференциально экспрессирующихся генов и подготовке публикаций. Все основные результаты исследования получены автором самостоятельно.

В ходе защиты диссертации членами Диссертационного совета д.б.н. Щербанем А.Б. и д.б.н. Аксенович Т.И. были высказаны замечания. Замечание д.б.н. Щербаня А.Б. касалось некорректности названия диссертации, требующего, с его точки зрения, выявления конкретных генов, отвечающих за контроль фенотипических признаков ячменя, связанных с частичным альбинизмом и меланизмом колоса, а замечание д.б.н. Аксенович Т.И. было связано с некорректностью использования термина «ассоциированные» в контексте данной работы.

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 2 «Компьютерная системная биология (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика, другие омиксные исследования)» и п. 12 «Разработка и применение новых вычислительных алгоритмов для анализа экспериментальных данных в биологии и медицине» паспорта специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика, а также п. 9 «Реализация генетической информации (транскрипция, трансляция). Механизмы регуляции экспрессии генов. Взаимодействие генов», п. 16 «Генетическая/молекулярно-генетическая биоинформатика и методы многомерного анализа» паспорта специальности 1.5.7 Генетика.

Диссертационный совет 21 февраля 2024 г. принял решение присудить Шмакову Н.А. ученую степень кандидата биологических наук за решение

обработки транскриптомных данных и их применением для изучения молекулярно-генетических механизмов формирования частичного альбинизма и меланизма у ячменя.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 члена совета, из них по специальности 1.5.8. - 7 докторов наук; по специальности 1.5.7. – 9 докторов наук из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 18, против – 3, недействительных бюллетеней – нет.

Зам. председателя

диссертационного совета,

Академик РАН, д.б.н.



Н.А. Колчанов

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор биологических наук

Т. М. Хлебодарова

21.02.2024 г.