

**ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

кандидата биологических наук

Букина Юрия Сергеевича

на диссертационную работу

**Турнаева Игоря Ивановича «Исследование эволюции белков триптофан
зависимого пути биосинтеза ауксина у растений», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.7 – генетика**

Актуальность диссертационной работы. Диссертационная работа И.И. Турнаева посвящена актуальной теме – исследованию эволюционной истории и происхождения у наземных растений важнейшего фитогормона ауксина. Ауксин играет значительную роль в индивидуальном развитии растений, регулируя процессы морфогенеза, формирования побегов и корней. Также ауксин проявляет свою активность в реакции растения на различные виды биотического и абиотического стресса. Исследование механизмов биосинтеза транспорта и метаболизма ауксина крайне важно для получения информации о механизмах контроля онтогенеза растений. Информация о механизме полного цикла биосинтеза ауксина позволит разработать механизмы контроля концентрации ауксина в клетках и тканях растений, что даст возможность регулировать рост и развитие растений на разных стадиях жизненного цикла и при различных внешних воздействиях. Полученные в ходе исследования данные могут быть применены в сельскохозяйственном растениеводстве и биотехнологических сферах для получения высокопродуктивных и стрессоустойчивых сортов растений, а также растений с контролируемой скоростью роста и заданным морфологическим строением. Одним из этапов в исследовании путей биосинтеза ауксина является изучение разнообразия генов растений, участвующих в этом процессе, и анализ эволюционной истории происхождения этих генов. В этой связи актуальность и современность диссертационной работы И.И. Турнаева несомненны.

Новизна научного исследования. В процессе выполнения диссертационной работы автором были получены новые результаты, дополняющие имевшиеся знания в исследуемой области. Исследования, проведенные путем анализа аминокислотных последовательностей белков, показали, что ферментные пути биосинтеза триптофана как часть цепи биосинтеза ауксина у высших растений произошли в результате эволюции от зеленых водорослей. Филогенетический анализ и анализ структуры белков харофитовых водорослей, сходных по аминокислотным последовательностям с белками биосинтеза ауксина из триптофана у высших растений, показал, что они не способны участвовать в биосинтезе ауксина, и задействованы в других ферментативных реакциях. Полученные результаты показывают, что путь биосинтеза ауксина из триптофана у высших растений не был унаследован от их предковых форм низших растений, а был приобретен в процессе горизонтального переноса предковых генов от

нерастительных таксонов. Проведенное в работе исследование семейств генов, участвующих в путях биосинтеза триптофана у высших растений, показало, что число копий генов в семействах увеличивается при увеличении сложности организации растительных организмов. Выводы диссертационной работы впоследствии были подтверждены в других независимых экспериментальных исследованиях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе выводы расширяют имевшиеся знания о молекулярных механизмах биосинтеза ауксина у высших растений. Результаты работы могут быть использованы в прикладных исследованиях для биотехнологических разработок механизмов контроля роста и стрессоустойчивости различных высших растений. Описанный в работе комплекс методов и конвейер по анализу данных может быть использован для исследования эволюционных механизмов происхождения различных биохимических и регуляторных путей у различных организмов. Сформированные в ходе выполнения работы массивы белковых данных могут быть использованы для целей обучения проведению всех этапов эволюционного и филогенетического анализа на основе аминокислотных последовательностей.

Содержание и оформление диссертации. Диссертационная работа И.И. Турнаева включает следующие разделы: введение; обзор литературы; материалы и методы; три главы, посвященные описанию результатам исследования; заключение по диссертации; выводы; список публикаций по теме диссертации; список литературы; приложение. Работа содержит 195 страниц текста, 27 основных рисунков, 10 таблиц и 3 рисунка в приложении. Список цитируемой литературы содержит 381 источник из них 8 ссылок на отечественные и 373 на международные издания. Около 18 ссылок на источники, публикующих результаты новейших исследований, выполненных в течение последних 5 лет.

Раздел введение содержит всю необходимую информацию об актуальности работы, отражает научную новизну, актуальность исследования и практическую значимость исследования, четко сформулированы цель, задачи и положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» дает информацию о значимости фитогормона ауксина в функционировании высших растений. Подробно рассмотрен процесс биосинтеза ауксина по триптофан-зависимому и триптофан-независимому пути. Дается информация о структурах и функциях семейств белков – ферментов, участвующих в синтезе ауксина. Представлена информация о метаболизме, транспорте и регуляции биосинтеза ауксина, участия ауксина в путях передачи регулирующих сигналов. Содержится информация о современном представлении на происхождение метаболического пути биосинтеза ауксина у высших растений. «Обзор литературы» в полной мере дает представление о тематике проводимого в рамках работы исследования.

Глава «Материалы и методы» дает развернутое описание спектра всех методов, используемых при проведении исследования. Подробно описан алгоритм формирования выборки аминокислотных последовательностей белков ферментов, участвующих в путях биосинтеза ауксина. Описаны программы,

применяемые для множественного выравнивания, аминокислотных последовательностей, программы для филогенетического анализа, для реконструкции эволюционной истории и корреляционного анализа. В работе использовались современные методы для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей, включающих программы для неструктурного выравнивания MAFFT и онлайн сервис для структурного выравнивания Promals. Для филогенетического анализа использовался метод максимального правдоподобия, реализованный в программах IQ-TREE и RAxML и Байесовский филогенетический метод, реализованные в программах PhyloBayes и mrBayes. Оценки статистической поддержки топологии филогенетических деревьев проводились с помощью метода сверхбыстрого бутстреп анализа. Поиск и анализ доменов и консервативных сайтов проводился с помощью онлайн инструмента CD-search и программы hhblits из пакета HH-site3 package.

Глава «Эволюция ферментов пути биосинтеза триптофана» содержит описание результата по исследованию происхождения метаболического пути биосинтеза триптофана у высших растений от предковых форм красных и зеленых водорослей. Представлены результаты эволюционных реконструкций, подтверждающих сделанные выводы.

Глава «Происхождение и эволюция ферментов пути таа/уисса биосинтеза ауксина у наземных растений» содержит подробное описание филогенетических реконструкций, описывающих эволюционные пути происхождения суперсемейства ТАА-подобных белков и белков семейства YUCCA у наземных растений. Приводятся результаты сравнительного анализа реконструированных трехмерных структур ТАА-подобных белков. Обсуждаются результаты идентификации и сравнения функциональных сайтов анализируемых белков. Результаты, описанные в данной главе, подтверждают гипотезу происхождения пути биосинтеза ауксина у высших растений путем горизонтального переноса из бактериальных геномов.

Глава «Анализ числа копий генов ферментов пути биосинтеза ауксина» описывает результаты по анализу взаимосвязи сложности организации растений с числом копий генов в семействах ферментативного пути синтеза ауксина. По результатам делается вывод о том, что гомологи ферментов ТАА и YUCCA присутствуют у всех исследованных таксонов наземных растений. Наблюдается значимая положительная корреляционная связь между сложностью организации растений и числа копий генов, кодирующих ферментативные пути биосинтеза триптофана. Делается предположения о том, что разные копии генов могут экспрессироваться в разных частях растений, находящихся в различных экологических условиях.

Глава «Заключение по диссертации» в краткой форме описывает все основные результаты и выводы исследования.

Автореферат диссертации содержит 19 страниц, написан по требуемой форме, содержит всю необходимую информацию и иллюстративный материал для понимания результатов исследования и соответствует содержанию основного текста диссертации.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов.

Диссертационная работа И.И. Турнаева выполнена на высоком научном уровне. Достоверность результатов работы и обоснованность выводов обусловлена адекватностью использованных подходов. Для анализа в работе использовалась достаточная выборка аминокислотных последовательностей белков, охватывающая широкий спектр таксономического разнообразия организмов. Результаты исследования подтверждаются методами статистического оценивания. Полученные выводы и защищаемые положения полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Данные диссертационной работы И.И. Турнаева были представлены и апробированы на 9 научных конференциях, автором работы опубликовано 3 научных статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных WOS и Scopus, во всех трех публикациях И.И. Турнаев является первым автором.

Замечания по диссертационной работе. К диссертационной работе могут быть высказаны следующие замечания:

- 1) В разделе описание (главы 3, 4 и 5) результатов приводятся и обосновываются некоторые технические параметры для запуска программ и анализа данных, которые следовало бы перенести в раздел «Материалы и методы».
- 2) Судя по структуре отображения, все реконструированные филогенетические деревья являются укорененными. При этом в разделе методы указано, что для укоренения дерева применялась внешняя группа только для белкового семейства YUCCA/FMO. Для филогенетических реконструкций по генам белков семейства ТАА никакого упоминания о внешней группе не делается. Каким образом проводилось укоренение филогенетических деревьев в этом случае?
- 3) Байесовский метод филогенетических реконструкций (программы PhyloBayes и mrBayes), используемый в работе, требует тщательного контроля на сходимость результатов оценки параметров, полученных при Монте-Карло моделировании Марковских цепей (MCMC). Для этого используется либо параметр «Average standard deviation of split frequencies» - накопительное различие между параметрами реконструкции различных цепей одной симуляции. Анализ MCMC показывает сходимость статистических оценок реконструкции, если значение «Average standard deviation of split frequencies» при завершении симуляций было менее 0.01. Другой способ оценки сходимости MCMC анализа- это расчёт значения ESS (Effective Sample Size). Анализ MCMC показывает сходимость статистических оценок при значении ESS для значений логарифмов показателей правдоподобия анализа в 200 и более единиц. Значения «Average standard deviation of split frequencies» и ESS выдаются программой mrBayes в логфайлах по завершению анализа. Какими были значения «Average standard deviation of split frequencies» и ESS по завершению анализа при выбранной длине цепи Маркова в 1000000 генераций для проводимых филогенетических реконструкций.
- 4) В приложении на рисунках П2 (Б) и П3(Б) автор демонстрирует филогенетические деревья, реконструированные Байесовским методом в

программе mrBayes. При этом в подрисуночной подписи сказано, что в узла этих деревьев отображена бутстреп поддержка. Байесовский метод при оценке достоверности топологии дерева использует другой подход и в качестве поддержки топологии дерева выдает оценённую апостериорную вероятность. Автору следовало бы сделать более корректное указание в подрисуночной подписи, а также указать на эти детали в разделе «Материалы и методы».

Заключение. Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа Игоря Ивановича Турнаева «Исследование эволюции белков триптофан зависимого пути биосинтеза ауксина у растений», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика, является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, в котором содержатся важнейшие результаты, позволяющие понять механизмы эволюции молекулярно-генетических систем растений. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с учетом всех редакций), а ее автор - Игорь Иванович Турнаев заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Официальный оппонент,
кандидат биологических наук (специальность 1.5.8 математическая биология, биоинформатика),
старший научный сотрудник
лаборатории геносистематики
ФГБУН Лимнологического института СО РАН
28.01.2025г. Ю.С. Букин Букин Юрий Сергеевич

Контактные данные:

Почтовый адрес: 664033 г. Иркутск, ул Улан Баторская - 3, а/я 278.

e-mail: bukinyura@mail.ru

тел: +7 (3952) 42-29-23

интернет-сайт: <http://lin.irk.ru/>

Подпись к.б.н., с.н.с. лаб. геносистематики

Ю.С. Букина заверяю

ученый секретарь ФГБУН

Лимнологического института СО РАН

к.б.н. Н.В. Максимова

