

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.218.01, СОЗДАННОГО НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ УФИМСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК, МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ
УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело №

решение диссертационного совета от 27 ноября 2024 года № 11

О присуждении Полховской Екатерине, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования» по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) принята к защите 12 сентября 2024 года (протокол заседания № 8) диссертационным советом 24.1.218.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (450054, город Уфа, Проспект Октября, 71, лит. 1Е; сайт организации: <http://ufaras.ru/>). Создание диссертационного совета утверждено приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 271/нк от 13 ноября 2018 года (частичные изменения от 30 октября 2020 года № 661/нк, 03 июня 2021 года № 561/нк, 25 января 2022 года № 75/нк, 22 марта 2022 года №257/нк, 14 февраля 2023 года №216/нк).

Текст диссертации размещен на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук 15 августа 2024 года (<http://ufaras.ru>)

Соискатель Полховская Екатерина Сергеевна 1 августа 1995 года рождения, с 2013 по 2019 гг. обучалась на факультете агрономии и биотехнологии в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева». В 2017 г. получила квалификацию «Бакалавр» по направлению подготовки 35.03.04 «Агрономия» (профиль «Селекция и генетика с/х культур»), в 2019 г. защитила выпускную магистерскую диссертацию для получения квалификации «Магистр» по направлению подготовки 35.04.04 «Агрономия» (профиль «Управление агробизнесом в растениеводстве»).

В период с 01 октября 2019 г. по 30 сентября 2023 г. обучалась в аспирантуре по очной форме обучения в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии». Сведения о сданных кандидатских экзаменах по дисциплине «История и философия науки (биологические науки)» от 06 декабря 2019 года, кандидатский экзамен по предмету «Иностранный язык (английский) (биологические науки)» от 25 июня 2020 года, по специальности «Генетика» (биологические науки) от 09 октября 2023 года прилагаются к личному делу.

В период подготовки диссертации, с апреля 2021 г., и по настоящее время занимает должность младшего научного сотрудника лаборатории маркерной и геномной селекции растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Диссертация выполнена в лаборатории маркерной и геномной селекции растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, Соловьев Александр Александрович, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ ВНИИКР).

Официальные оппоненты

Гончаров Николай Петрович – доктор биологических наук, академик РАН, главный научный сотрудник сектора генетики пшениц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦИГ СО РАН) (630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, дом 10);

Казакова Елизавета Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ) (249035 Россия, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, д. 1, корп. 1).

дали положительные отзывы на диссертацию (отзывы прилагаются).

Официальный оппонент, доктор биологических наук, академик РАН Гончаров Николай Петрович в своем положительном отзыве, отмечая актуальность, новизну, научную и практическую значимость работы, озвучил следующие вопросы и замечания:

1. Не очень удачно сформулированы предложения, например, «составом клейковины – основного запасного компонента в эндосперме зерна...» (с.29) или «В транскрипции генов ... участвуют транскрипционные факторы (ТФ)...» (с.37).

2. В Списке сокращений (с.4-7) желательно было бы указать не только Glu – глютен (с.5), но и Gli – глиадин. В нем же (с.7) не совсем точно расшифровано обозначение генов Vrn – “vernalization”, д. б. “response to vernalization”.

3. На стр. 24 во фразе «Ген FZP изменяет структуру колоска...», д.б. «колоса». Иначе в этой фразе получается, что изменение структуры колоска происходит за счет формирования дополнительных колосков(!?).

4. Встречаются также некоторые несогласования слов: «транскриптов последовательности геномов» вместо «последовательностей» (с. 62).

5. Видовые названия даны не курсивом (с.120, 124, 126, 129, 132, 134, 142 и др.), либо наоборот - курсивом даётся и имя автора вида (с. 105). Есть вариант написания и видового, и родового эпитета с заглавной буквы (с.141).

6. Раздел «1.4. Запасные белки зерновки пшеницы и тритикале» желательно было бы начать с характеристик запасных белков: какие из них водо-, какие спирторастворимые.

7. Не очень хорошо менять язык, используя то русское «вставка» (с. 60, с.71), то английское “InDels” (с. 60, с.71), причем нигде не говоря о делециях, а только о вставках (с.60, с.71).

Официальный оппонент, кандидат биологических наук Казакова Елизавета Александровна в своем положительном отзыве, отмечая новизну и практическую значимость работы, озвучила следующие замечания и вопросы:

1. Автором проанализировано большое количество публикаций по теме работы и написан подробный обзор литературы. На мой взгляд раздел «Запасные белки зерновки пшеницы и тритикале» следовало поместить перед описанием селекционно-генетических аспектов качества зерна тритикале для сохранения логики изложения.

2. В разделе «Материалы и методы» довольно подробно расписаны методики исследования. Однако не хватает обозначения объёмов выборки: сколько зерновок, проростков взято на каждое условие эксперимента для выделения образцов тотальной РНК и геномной ДНК; необходимо уточнить также, сколько образцов ДНК, РНК было получено.

3. В разделе «Материалы для исследования» не указано как проходило культивирование проростков яровой тритикале, которые в дальнейшем использовались для выделения тотальной ДНК.

4. Так как работа состоит из нескольких частей и раздел «Материалы и методы» достаточно объёмный, для обобщения общего дизайна эксперимента я бы порекомендовала в этом разделе размещать схему эксперимента в виде рисунка.

5. Интересным результатом работы является выявление для генов глютеенинов высокого уровня метилирования кодирующей области гена по сравнению с промоторной. Возможно ли в дальнейшем получить количественную оценку метилирования ДНК полноразмерных генов глютеенинов?

6. Рисунок 10 на стр. 75 работы несёт в себе важную информацию о метилировании по результатам нанопорового секвенирования, однако изображение довольно низкого качества. Для улучшения восприятия в дальнейшем рекомендуется усовершенствовать качество рисунка.

7. В разделе 3.2.1 появляется информация о выделении ДНК из половинок зерновок 23 сортов пшеницы для секвенирования целевых генов методом ONT Amplicon-Seq, а также о названии и происхождении сортов. Эти данные следовало привести в разделе «Материалы и методы». Также раздел «Материалы и методы» дополнила бы информация, представленная на стр. 94 работы, об отборе зерновок для выделения РНК на 15 и 20 день после цветения. На стр. 94 не указано, проводился ли отбор на 10 день после цветения.

8. Раздел 3.2.4 представляет собой обсуждение преимуществ Nanopore Amplicon-Seq для анализа HMW-G. Также в главе «Результаты исследования» встречалось и обсуждение результатов. Таким образом, главу следовало бы назвать «Результаты исследования и их обсуждение». Следует отметить, что более развёрнутое обсуждение полученных данных также украсило бы диссертационную работу.

9. Автором показано, что транскриптомы развивающихся зерновок яровой тритикале на ранней и средней/поздней стадиях сильно отличаются с точки зрения экспрессируемых генов и их функций, в частности продемонстрирована экспрессия генов, участвующих в негативной регуляции активности пептидаз на поздних стадиях развития зерновки тритикале. Из текста диссертации не вполне понятно, была ли обнаружена экспрессия генов фитоцистатинов, которые участвуют в контроле протеолиза?

В отзывах официальных оппонентов дано заключение, что диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны на тему «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования» по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки)

является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук, профессора, профессора РАН заместителя директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ ВНИИКР) Соловьева Александра Александровича, в которой представлено решение крупной научной проблемы, имеющей важное фундаментальное и прикладное значение для повышения качества структурной аннотации геномов тритикале и пшеницы. Оптимизированные подходы целевого нанопорового секвенирования для анализа полноразмерных генов хозяйственно-ценных признаков в сложных геномах злаковых (тритикале и пшеница) и секвенирование РНК и кДНК зерновок на разных этапах развития позволяют получить информацию о наборе экспрессируемых генов, связанных с ключевыми процессами, вовлеченными в формирование качества зерна.

Диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Полховская Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Соискатель Полховская Екатерина Сергеевна дала исчерпывающие ответы на вопросы оппонента д.б.н., академика РАН Гончарова Николая Петровича и к.б.н. Казаковой Елизаветы Александровны, которые полностью удовлетворили оппонентов. При ответе на вопросы оппонента д.б.н. Гончарова Николая Петровича Полховская Екатерина Сергеевна указала на то, что: она согласна с замечаниями, указанными в 1, 2, 4 и 5 пунктах, о применении понятий и формулировок, используемых в диссертационной работе, относительно редакционных и синтаксических погрешностей и отсутствия аббревиатуры в Списке сокращений. Фраза «Ген FZP изменяет структуру колоска...» в обзоре литературы данной диссертационной работы является погрешностью лексического характера, т.к. имелось в виду «структура колоса», а не формирование дополнительных колосков. Согласна с предложением оппонента, что Раздел «1.4. Запасные белки зерновки пшеницы и тритикале» в обзоре литературы желательно начать с характеристик запасных белков: какие из них водо-, какие спирторастворимые. Отмечено, что обзор литературы был сфокусирован на генах глютелинах, поэтому в данном разделе сделан акцент именно на них. Что касается использования «русское «вставка» и английское «InDels»», согласна с некорректным употреблением английского «InDels» в разделе 2.2.8, где уместнее было бы использовать только определение «вставка».

В ответе Полховской Екатерины Сергеевны к.б.н. Казаковой Елизавете Александровне прозвучало, что с замечаниями, которые указаны в 1, 6 – 8 пунктах, редакционного характера согласна. По поводу уточняющего вопроса, касающегося раздела «Материалы и методы», для выделения РНК отбирали 10 зерновок на каждом этапе развития, следовательно, для транскриптомного анализа использовали 3 образца – 10, 20, 30 dpa (на 10, 20 и 30 день после цветения, соответственно). Выделение ДНК (для методов nCATS, Ampli-con-seq и оценки полиморфизма днРНК) проводили из одного 4-х дневного проростка соответствующего образца, т.е. для nCATS была получена ДНК из одного образца тритикале линии Л8665, для ONT Ampli-con-seq и анализа полиморфизма днРНК по 23 образцам ДНК яровой пшеницы и тритикале, соответственно. Дизайны экспериментов приведены в главе «Результаты исследований» в соответствии с каждой их трех частей исследования. Чтобы в дальнейшем получить количественную оценку метилирования ДНК полноразмерных генов глютелинов, соискатель отметила, что nCATS применяется для количественного анализа профиля метилирования целевых генов, однако является низкоэффективным для генов глютелинов, т.к. полученного покрытия было недостаточно для такого анализа всех целевых фрагментов в данном исследовании. Альтернативным подходом может являть бисульфитное секвенирование, но обработка бисульфитом повреждает ДНК и в сочетании с секвенированием короткими ридами осложняет изучение полноразмерных генов глютелинов, содержащих в себе повторяющиеся элементы. Наиболее подходящим способом количественной оценки метилирования ДНК может являться сочетание энзиматической конверсии, которая представляет собой ферментативную альтернативу обработке бисульфитом, в сочетании с секвенированием длинными ридами. Относительно вопроса об отборе зерновок для выделения РНК, действительно, на указанной странице (стр. 94) нет упоминания про 10 dpa, но для анализа учитывались 3 стадии развития зерновки (10, 15, 20 dpa), что подтверждается рисунком 22 на странице 95 и указывается на странице 99. Что касается обнаружения экспрессии генов фитоцистатинов, с помощью GO-анализа были выявлены ингибиторы активности пептидаз, представителями которых могут являться фитоцистатины. Однако именно экспрессия генов фитоцистатинов не была обнаружена.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН) в своем положительном отзыве, подписанном заведующим лабораторией генетики растений ИОГен РАН, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук Кудрявцевым Александром Михайловичем, и утвержденном доктором биологических

наук, и.о. директора ИОГен РАН Мисюриным Андреем Витальевичем, указал, что результаты диссертационного исследования формируют, что результаты диссертационного исследования обладают уникальными данными об эпигенетическом профиле метилирования генов глютеинов и о генах, вовлеченных в процесс развития зерновок. Оптимизация протоколов нанопорового секвенирования для тритикале и пшеницы позволила обнаружить структурные вариации глютеин-кодирующих генов, выявить новый аллельный вариант, и различия в кодирующей области генов и промоторов. Комплексный транскриптомный анализ позволил идентифицировать гены, которые экспрессируются на разных стадиях развития зерновки, а также автором показаны различия между наборами генов, экспрессирующихся в зародыше и эндосперме.

При изучении и коллективном обсуждении диссертационной работы Е.С. Полховской были сформулированы следующие замечания:

1. В качестве одного из главных замечаний к работе можно указать достаточно вольное обращение автора с определениями и терминами. Например, работа начинается с фразы: «Зерновка - это важнейший орган злаковых растений». Да, так порой говорят ботаники, но это строго говоря неверно. Любое семя — это новый организм, а с точки зрения генетики и другое поколение в отношении исходного растения. Даже эндосперм возникает у цветковых растений в результате двойного оплодотворения. Или, часто в работе пишут о глютеинах, как о генах, например: «аллели глютеинов». Но глютеин это белок, и никаких аллелей у него быть не может. Правильнее писать аллели глютеин-кодирующих генов. Также авторы часто называют генами локусы глютеин-кодирующих генов (Glu), но локусы этих генов содержат множество отдельных генов, о чем следует помнить, составляя фразы.

2. В разделе «Обзор литературы» автором приводятся данные о биологических особенностях тритикале, хотя объектом исследования является также и мягкая пшеница. Возможно, следовало дополнить данный раздел также и характеристикой пшеницы.

3. В разделе 2 «Материалы и методы исследования» отсутствует список образцов, которые были взяты для исследования. Недостаточно подробно описано, как проводился отбор растительного материала для анализа транскриптома зерновки, в каких условиях выращивались растения и сколько повторностей анализировали, что является важным для интерпретации полученных результатов о различиях между составом транскриптов, выявленных на разных стадиях развития зерновки. Кроме того, для сравнения транскриптомов на разных стадиях развития зерновки правильнее бы было использовать одинаковые методы для пробоподготовки образцов. Не указаны использованные для анализа версии геномов и соответствующие им номера

последовательностей в используемых базах данных. Также не указаны номера последовательностей ВАС. Кроме того, стоило указать версии используемых программ и параметры для их запуска.

4. При проведении Cas9-опосредованного нанопорового секвенирования (nCATS) генов высокомолекулярных глютеинов тритикале в анализ было взято три гена Glu-1Ax, Glu-1Bx и Glu-1By, однако результаты приводятся только по двум генам Glu-1Bx и Glu-1By (подраздел 3.1).

5. В подразделе 3.2.3 «Филогенетический анализ аллелей генов глютеинов» автор указывает, что для 23 образцов пшеницы обнаружен 21 аллельный вариант, но фактически их выявлено 20 (аллельный вариант Glu-1By8 повторен дважды (подраздел 3.2.2)).

6. В подразделе 3.2.4 автор выявляет преимущества ONT Amplicon-Seq в сравнении с классическим методом белкового электрофореза (SDS-PAGE), однако не упоминает стоимость проведения данных анализов и возможность их широкого использования.

7. Достаточно сложно изложен раздел 3.3 «Анализ транскриптома зерновок тритикале с помощью нанопорового секвенирования». Так, не понятно сколько стадий изучал автор (на странице 93 - 3 стадии (10, 15, 20 dpa), на странице 94 - 2 стадии (15 и 20 dpa)). Также не до конца ясна информация про аннотацию новых генов. В подразделе 3.3.2. «Характеристика генов, экспрессирующихся на разных стадиях развития зерновки» указываются названия классов генов/семейств генов, однако не понятно - были эти гены ранее аннотированы или нет? Или же это данные по общему пулу идентифицированных генов?

8. Подраздел 3.3.3. «Особенности транскриптома зародыша и эндосперма развивающейся зерновки» практически не содержит информацию о генах, экспрессирующихся только в эндосперме на разных стадиях.

Отвечая на вопросы ведущей организации, Полховская Е.С. отметила, что с замечаниями, которые указаны в пунктах 1 и 5, относительно применения понятий и формулировок, используемых в диссертационной работе, редакционных погрешностей, согласна. По поводу замечания о включении биологических особенностей мягкой пшеницы в обзор литературы, соискатель ответила, что в разделе обзор литературы представлена характеристика пшеницы, но некоторые из глав некорректно в названии отражают только одну культуру (тритикале). Однако, ввиду того, что тритикале, являясь амфидиплоидом ржи и пшеницы, не соответствует исходным родительским формам, основной акцент в работе был сделан на характеристике тритикале. Относительно уточнений по поводу

раздела «Материалы и методы», а именно об отборе растительного материала, списке образцов и версиях геномов и используемых программ, было сообщено, что данная информация действительно не отражена в разделе «Материалы и методы», однако список образцов, которые были взяты для каждого из трех экспериментов, приведен в разделе «Результаты исследования»; версии геномов, которые использовали для анализа отражены в разделе 3.3.1. В разделе 2.2.17 приведены программы, которые применяли для анализа, а также их параметры. Соискатель согласна, что для программ не указана версия, но дана ссылка на разработчиков алгоритмов. Растения тритикале для транскрипционного анализа были выращены в теплице при световом режиме 16/8 ч. день/ночь. Отбор проб предусматривал 10 зерновок для каждого изучаемого этапа. Что касается результатов, полученных при проведении Cas9-опосредованного нанопорового секвенирования (nCATS), действительно результаты приводятся только по двум генам Glu-1Bx и Glu-1By (подраздел 3.1), т.к. для гена Glu-1Ax было получено наименьшее количество целевых ридов, которые не позволили провести анализ гаплотипов или выявить структурные вариации. Сравнение стоимости применения ONT Amplicon-Seq и белкового электрофореза (SDS-PAGE) не проводили, т.к. в данной работе акцент был сделан на установление эффективности и результативности применения двух методологических подходов. Относительно вопроса об отборе зерновок для выделения РНК, действительно, на указанной странице (стр. 94) нет упоминания про 10 дра, но для анализа учитывали 3 стадии развития зерновки (10, 15, 20 дра), что подтверждается рисунком 22 на странице 95 и указывается на странице 99. По поводу классов генов/семейств генов в подразделе 3.3.2, названия даны для всех идентифицированных генов на 3 стадиях развития зерновки (10, 15, 20 дра), т.е. по общему пулу идентифицированных генов (что отражено на странице 99). Дан комментарий относительно генов, экспрессирующихся только в эндосперме на разных стадиях, так на рисунке 28 отражено количество генов, экспрессирующихся на 15 и 20 дра в эндосперме, а именно, 1121 и 1611, соответственно. В данной части исследования отмечено, что LTR-ретротранспозон (TE) MIG Ty1/Copia, идентифицированный в ранних исследованиях, экспрессируется в эндосперме.

Диссертационная работа и отзыв обсуждены и одобрены на заседании лаборатории генетики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), протокол № 2 от 24 октября 2024 г. В заключении отмечается, что диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по

специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, имеющей важное значение для биологической науки. Данную диссертацию можно признать научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи - оптимизированы подходы для целевого секвенирования полноразмерных генов пшеницы и тритикале, благодаря которым впервые получена информация об эпигенетическом профилировании глутенин-кодирующих генов, а также с помощью нанопорового секвенирования проведен комплексный транскриптомный анализ развивающейся зерновки тритикале. Диссертационная работа соответствует требованиям п.9-11,13,14, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Полховская Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Соискатель имеет 3 опубликованные работы, которые индексируются в международных базах Web of Science и Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени кандидата наук работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Публикации посвящены оптимизации Cas9-опосредованного нанопорового секвенирования (nCATS) в качестве потенциального инструмента для таргетного секвенирования целевых генов яровой тритикале. В них отражено использование ONT Amplicon-Seq для выявления SNPs, InDels, новых аллельных вариантов, а также поиска различий как в кодирующей области генов глутенинов, так и в промоторах, которые невозможно выполнить с помощью электрофореза SDS-PAGE. Работа посвящена комплексному транскриптомному анализу с использованием секвенирования длинными ридами кДНК и РНК на ранней (10 dpa), средней (15 dpa) и поздней (20 dpa) стадиях развития зерновки тритикале.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Polkhovskaya E. et al. Nanopore Amplicon Sequencing Allows Rapid Identification of Glutenin Allelic Variants in a Wheat Collection //Agronomy.–2023.–Т. 14. – №. 1. – С. 13. Q1.
2. Polkhovskaya E. et al. Long-Read cDNA Sequencing Revealed Novel Expressed Genes and Dynamic Transcriptome Landscape of Triticale (x Triticosecale Wittmack) Seed at Different Developing Stages //Agronomy. – 2023. – Т. 13. – №. 2. – С. 292. Q1
3. Kirov I., Polkhovskaya E. et al. Searching for a needle in a haystack: Cas9-targeted Nanopore sequencing and DNA methylation profiling of full-length glutenin genes in a big cereal genome //Plants. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 5. Q1

На диссертацию и автореферат поступило 6 отзывов:

1. Отзыв кандидата биологических наук, научного сотрудника кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» **Ганчевой Марии Семеновны**. Отзыв положительный, с тремя вопросами и замечаниями: 1. Из каких частей растений была выделена ДНК для определения метилирования генов глютеинов? 2. С чем связано получение фрагментов разной длины при амплификации гена *Glu-1A α* ? 3. При анализе полиморфизма транскриптов тритикале, как оценивали отклонение от референсной ДНК-матрицы?
2. Отзыв кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника группы молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» **Ворониной Елены Николаевны**. Отзыв положительный, с одним замечанием: Желательно было подробнее рассмотреть роль генов, экспрессия которых меняется на разных стадиях развития зерновки, особенно в свете изменения экспрессии генов глютеинов.
3. Отзыв кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН **Тюрина Александра Александровича**. Отзыв положительный, с одним замечанием: В тексте автореферата диссертации изредка встречаются несогласованные и двусмысленные предложения; что, тем не менее, никак не влияет на содержательное наполнение и качество представленного исследования.
4. Отзыв кандидата сельскохозяйственных наук, доцента кафедры растениеводства и селекции Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный аграрный университет» **Сергеевой Людмилы Борисовны**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Отзыв кандидата биологических наук, младшего научного сотрудника лаборатории системного анализа белков и пептидов Государственного Научного Центра Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ГНЦ ИБХ РАН) **Ляпиной Ирины Сергеевны**. Отзыв положительный, без замечаний.

б. Отзыв доктора биологических наук, главного научного сотрудника отдела биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения Национальный центр зерна имени П. П. Лукьяненко **Давояна Эдварда Румиковича**. Отзыв положительный, без замечаний.

Соискатель Полховская Екатерина Сергеевна ответила на все замечания, указанные в отзывах на автореферат диссертации. Отвечая на вопросы Ганчевой Марии Семеновны о растительном материале, который был взят для определения метелирования, соискатель указал, ДНК была выделена из 4-х дневного проростка зерновки яровой тритикале линии Л8665. По поводу интерпретации полученных фрагментов при амплификации гена *Glu-1A_y*, благодаря анализу последовательностей *Glu-1A_y*, полученных с помощью ONT Amplicon-Seq, было обнаружено два аллеля в исследуемой коллекции пшеницы. Можно предположить, что разная длина фрагментов на рисунке 7 автореферата диссертации обусловлена наличием делеции в аллеле *Glu-1-A_y-d*, относительно аллеля *A1y/Td-s*. Относительно анализа полиморфизма транскриптов тритикале, были подобраны фланкирующие праймеры на структурные вариации днРНК. Затем проводили амплификацию на 23 линиях яровой тритикале, контролем являлся сорт пшеницы Chinese Spring. ПЦР-продукты, имеющие разные размеры, отправляли на секвенирование по Сенгеру для подтверждения наличия InDels.

Отвечая на замечание Ворониной Елены Николаевны о более подробном рассмотрении роли генов, экспрессия которых меняется на разных стадиях развития зерновки, было отмечено, что в диссертационной работе рассмотрены гены на средней/поздней стадиях развития зерновок, связанные с ингибиторами активности пептидаз, которые могут негативно сказываться на накоплении запасных белков.

Соискатель согласилась с замечаниями Тюрина Александра Александровича по поводу редакционных и стилистических погрешностей.

Во всех отзывах на автореферат отмечается, что работа Полховской Екатерины Сергеевны является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи, имеющей важное значение для биологической науки. Отмечено, что диссертационная работа выполнена в полном объеме на высоком научном и методическом уровне, выводы диссертации достоверны и полностью отражают поставленные задачи. Во всех отзывах указано, что диссертационная работа отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13,14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук, а ее автор Полховская Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) (отзывы прилагаются).

Выбор официальных оппонентов обосновывается следующим:

Гончаров Николай Петрович – доктор биологических наук, академик РАН, главный научный сотрудник сектора генетики пшениц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), является высококвалифицированным специалистом в области генетики растений, занимается изучением частной и сравнительной генетики пшениц и их сородичей, а также методическими основами селекции растений и историей генетики и селекции растений, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы.

Казакова Елизавета Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ) является высококвалифицированным специалистом в области изучения морфофизиологических, биохимических, генетических характеристик и транскриптомного профиля различных сельскохозяйственных культур, в частности зерновых, с использованием высокопроизводительного секвенирования, что предполагает возможность всестороннего анализа оппонируемой работы. Оппоненты имеют соответствующие публикации в журналах из Перечня ВАК и дали свое согласие быть оппонентами диссертационной работы Полховской Екатерины Сергеевны.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ФГБУН ИОГен РАН) проводят научные исследования по направлениям, соответствующим теме диссертационного исследования в области генетики растений, популяционной генетики, изучения структурно-функциональной организации генома, выяснения механизмов регуляции и экспрессии генов, установления генетических принципов селекционной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложены новые подходы целевого нанопорового секвенирования полноразмерных генов хозяйственно-ценных признаков в сложных геномах злаковых (тритикале и пшеница), что позволило изучить ДНК полиморфизм и эпигенетический профиль генов глютеинов;

идентифицированы 2340, 2947 и 1841 ранее неаннотированных генов в субгеномах А, В и R, экспрессирующихся на разных этапах развития зерновки. Анализ белок-кодирующего потенциала этих генов показал, что 45% генов кодируют длинные белок-некодирующие (днРНК), в то время как среди аннотированных генов их доля не превышает 5%;

показаны различия между генами, экспрессирующимися в разных частях зерновки: в образцах с зародышевой частью наиболее представлены экспрессирующиеся гены, кодирующие белки комплекса оксидоредуктазы и комплекса мембранных белков, которые вовлечены в процессы фосфорорганического метаболизма. Наиболее значимо в наборе генов, экспрессирующихся в зародышевой части были представлены гены, кодирующие белки рибонуклеопротеинового комплекса, комплекса убиквитинлигазы, и вовлеченные в сайленсинг генов, биогенез рибосом, процессинг РНК и трансляцию;

отмечена эффективность применения подхода секвенирования, основанного на ПЦР-амплификации при оценке вариаций, как в кодирующей, так и в промоторной областях гена глютеинов, благодаря которому за короткое время можно легко обнаружить различные вариации генов у разных растений и в больших коллекциях;

доказано, метод Amplicon-Seq является эффективным для обнаружения различных вариаций в больших коллекциях зерновых. Данный подход, помимо идентификации структурных вариаций в известных аллелях, позволил выявить новый аллельный вариант гена глютеина, имеющий несинонимичную замену, который представляет интерес для функциональной характеристики;

выявлена впервые для генов глютеинов уникальная информация о метилировании ДНК с помощью секвенирования nCATS. Эпигенетический профиль для всех трех генов был схожим: низко метилированная промоторная область и сильно метилированная кодирующая последовательность.

создана база транскриптов, которая содержит набор, состоящий из 6057, 1575 и 3274 генов, специфически экспрессирующихся на ранней, средней и поздней стадиях развития зерновки тритикале, соответственно. Доля днРНК среди аннотированных транскриптов составляет 4,6% (879) на ранней, 42,7% (1756) на средней и 31,6% (1739) на поздней стадиях развития зерновки.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

проанализированы данные о динамике транскриптома, которые значительно расширяют список известных генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся на разных стадиях развития зерновки. Идентифицированные ранее неаннотированные гены могут быть использованы для последующего функционального анализа, что позволит глубже понять молекулярные механизмы, вовлеченные в развитие зерновки. Идентифицированные гены могут быть использованы для поиска мишеней для маркер-опосредованной селекции и ускоренного отбора ценных генотипов с улучшенными хлебопекарными качествами;

раскрыта особенности транскриптома развивающейся зерновки тритикале и определена доля генов (более 10% транскриптома) длинных некодирующих РНК, экспрессирующихся в процессе развития зерновки тритикале;

применительно к проблематике диссертации результативно **использован** комплекс современных, в том числе высокотехнологичных, подходов высокопроизводительного нанопорового секвенирования как РНК и кДНК, так и целевых генов;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Разработано и экспериментально апробировано секвенирование nCATS, которое позволяет проводить эпигенетическое профилирование генов-мишеней у растений, что может помочь в решении важных задач, от разработки маркеров для селекции растений до изучения фундаментальных вопросов регуляции экспрессии генов, что является особенно важным для растений с большим размером генома, где секвенирование всего генома является трудоемким и дорогостоящим.

Создана уникальная база, содержащая комплексный транскриптомный анализ, который позволил идентифицировать 7128 ранее неаннотированных генов, экспрессирующихся на разных стадиях развития зерновки тритикале (10, 15, 20 дней после цветения). Полученные данные секвенирования позволили проанализировать транскрипты по белок-кодирующему потенциалу, а также выявить особенности транскриптома зародыша и эндосперма зерновки с целью повышения качества структурной аннотации генома тритикале.

Показано что нанопоровое секвенирование ампликонов позволяет анализировать отдельные растения, что особенно важно при оценке селекционного материала в ранних поколениях гибридов. При этом для выделения ДНК и проведения ПЦР требуется немного растительного материала (100 мг), что даёт возможность проводить анализ на самых ранних этапах развития растений.

Получен патент на изобретение – Патент №2785924 С1 от 15.12.2022 г. Способы одновременного нанопорового секвенирования полных последовательностей значимых генов твердой пшеницы // Патентообладатель ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии" / Авторы: Киров И.В., Меркулов П.Ю., Полховская Е.С., Власова А.В., Дудников М.В., Соловьев А.А., Карлов Г.И., Дивашук М.Г.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

достоверность полученных результатов подтверждается проведением исследований на репрезентативных выборках, с использованием сертифицированного оборудования и применением методов, соответствующих современным стандартам и общемировым требованиям, автором проведён большой объём экспериментальных исследований, которые отличаются высоким уровнем чувствительности и объективности. Обработка данных была выполнена с использованием программного обеспечения, необходимого для проведения биоинформатического и статистического анализа экспериментальных данных.

Корректность и высокий научный уровень проведённых исследований подтверждены публикацией основных результатов исследования в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах. Материалы диссертации также были представлены на Всероссийских и международных конференциях, конгрессах и конкурсах.

Теория работы построена на известных, надёжно верифицируемых данных и фактах, согласующихся с ранее опубликованными материалами по теме диссертации;

идея базируется на глубоком анализе современной зарубежной и литературы, освещающей современные достижения в области селекционно-генетических аспектах создания продуктивных форм зерновых культур, данные о динамике транскриптома в процессе развития зерновки, о запасных белках зерновки пшеницы и тритикале, о классификации и функциях длинных некодирующих РНК, о секвенировании и аннотации геномов пшеницы, ржи и тритикале, а также секвенирование целевых последовательностей;

использованы современные данные научных исследований по теме диссертации, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, а также информация из баз данных для сравнения полученных в работе данных с результатами предшествующих исследований;

установлена сопоставимость результатов настоящего исследования с данными, полученными в других, более ранних работах зарубежных и отечественных научных коллективов;

использовано современное оборудование с применением соответствующих мировому уровню исследований методов молекулярной биологии и биоинформатики.

Личный вклад соискателя заключается в ключевой роли в выработке цели и направления исследования, определении общей концепции, постановке задач, выборе плана работы и методологии исследования, проведении экспериментов, написании диссертации. Описанные в диссертационной работе экспериментальные результаты, касающиеся всех проведенных биологических испытаний, статистическая обработка, анализ данных и их публикация проведены автором лично, либо при его непосредственном участии.

В ходе защиты диссертации критические замечания высказаны не были, заданы вопросы уточняющего и конкретизирующего характера. Соискатель Полховская Екатерина Сергеевна ответила на все вопросы в ходе заседания.

На заседании 27 ноября 2024 года Диссертационный совет пришел к выводу, что совокупность защищаемых положений позволяет заключить, что диссертация Полховской Екатерины Сергеевны «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования» имеет большое научное и практическое значение для значения для повышения качества структурной аннотации генома тритикале и пшеницы, а оптимизированные подходы нанопорового секвенирования позволяют получать информацию о наборе экспрессируемых генов, связанных с ключевыми процессами, вовлеченными в реализацию качества зерна. Диссертация является цельным и законченным научным исследованием, обладающим внутренним единством изложения, выводы полностью соответствуют поставленным задачам и подчинены единству концепции диссертационного исследования.

Диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

На заседании 27 ноября 2024 года диссертационный совет 24.1.218.01 принял решение присудить Полховской Екатерине Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки), участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 17, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

| | |
|---|---|
| <p>Председатель диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., профессор, член- корреспондент РАО</p> |  / Хуснутдинова Эльза Камилевна |
| <p>Заместитель председателя диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент</p> |  / Карунас Александра Станислововна |
| <p>Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.218.01, д.б.н., доцент</p> |  / Корытина Гульназ Фаритовна |
| | <p>«27» ноября 2024 года</p> |