

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**



**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
(ИОГен РАН)**

ул. Губкина, д. 3, г. Москва, ГСП-1, 119991
Тел.: (499) 135-62-13, (499) 135-20-41
Факс: (499) 132-89-62

E-mail: iogen@vigg.ru
http: www.vigg.ru

24. 10. 2024

№ 92 - 02-13/566

УТВЕРЖДАЮ:

На № _____



И.о. директора ФГБУН ИОГен РАН,
д.б.н.
А.В. Мисюрин
«24» 10 2024 г.

Отзыв ведущей организации на диссертационную работу

Полховской Екатерины Сергеевны

«Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны посвящена геномному и транскриптомному анализам генов, вовлеченных в формирование зерновки у пшеницы и тритикале. В связи с высоким хозяйственным значением, процесс формирования зерновки данных злаковых культур является очень перспективным для исследования, однако этот процесс сложен для изучения из-за высокой динамичности и вовлечения большого количества генов. Автор подчеркивает, что в настоящее время имеется не так много информации об аннотированных генах пшеницы и тритикале, в том числе о генах днРНК, которые

остаются практически неисследованными, и о транскриптомных изменениях во время развития зерновки.

Идентификация этих генов и изучение их экспрессии на разных этапах формирования зерновки является интересной и важной научной задачей, решение которой становится возможным с применением новых технологий секвенирования протяженных последовательностей (например, Oxford Nanopore Technology), позволяющих улучшить аннотацию генома, эффективно выявлять как белок кодирующие, так и не кодирующие гены.

Глютенины являются одними из основных запасных белков зерновки пшеницы и тритикале и оказывают большое влияние на качественные характеристики зерна и муки. При этом хлебопекарные свойства в большей степени зависят от высокомолекулярных глютеинов. Гены, кодирующие высокомолекулярные глютеины, достаточно хорошо изучены, идентифицированы аллельные варианты данных генов с различным влиянием на качество муки. Дальнейшее изучение полиморфизма данных генов, а также их регуляторных областей, поможет в идентификации новых аллельных вариантов, потенциально ценных в селекции на качество. Различные варианты нанопорового секвенирования (Cas9-опосредованное нанопоровое секвенирование (nCATS) и нанопоровое секвенирование ампликонов (ONT Amplicon-seq)) могут быть применены для целевого секвенирования и дальнейшего изучения отдельных генов, особенно для таких видов растений как пшеница и тритикале, ввиду сложности их геномной организации (наличие нескольких субгеномов, большого количества повторов). Такие подходы, помимо идентификации полиморфизма, позволяют изучать метилирование, влияющее на экспрессию генов.

Таким образом, работа Полховской Е.С. по изучению генов, вовлеченных в формирование зерновки у пшеницы и тритикале, с помощью современных методов нанопорового секвенирования является актуальной.

Научная новизна исследования и практическая значимость

В диссертационной работе Полховской Е.С. с помощью метода nCATS продемонстрировано, что глютеин-кодирующие гены тритикале обладают

уникальным эпигенетическим профилем метилирования с гиперметирированной белок-кодирующей частью и гипометирированной областью промотора. Вопрос о роли метилирования в регуляции экспрессии глютенинов требует дальнейшего изучения.

Оптимизированный протокол нанопорового секвенирования ампликонов (ONT Amplicon-Seq) позволил обнаружить структурные вариации глютенин-кодирующих генов, выявить новый аллельный вариант, имеющий несинонимичную замену, приводящую к изменению аминокислотной последовательности, и различия в кодирующей области генов и промоторов глютенинов.

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. Был выявлен ряд генов, которые не были аннотированы как транскрипционно активные.

Апробация методов ONT секвенирования на мягкой пшенице и тритикале выявило их эффективность, что позволит в дальнейшем использовать их для изучения и других групп генов данных культур.

Таким образом, полученные Полховской Е.С. результаты имеют научную новизну, а также практическую значимость.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Полученный с использованием современных методов научные результаты и выводы Полховской Е. С. полностью отвечают сформулированным цели и задачам исследования. В исследовании использовались молекулярно-генетические методы для анализа транскриптома развивающейся зерновки тритикале и оценки структурной организации глютенин-кодирующих генов. Результаты обусловлены адекватностью выбранных методических подходов, правильностью использования этих методов, систематизацией полученных данных. Выдвигаемые положения и выводы аргументированы фактическими данными.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, основные результаты исследования, заключение, выводы, список литературы и приложения. Работа изложена на 145 страницах печатного текста, содержит 11 таблиц, 30 рисунков и 3 приложения. Список литературы включает 271 источник, из них 254 – на иностранных языках.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность темы исследования и степень ее разработанности, ее научную новизну и значимость, формулирует цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту. Цель исследования сформулирована четко, поставленные автором задачи корректны для ее достижения. Основные положения, выносимые на защиту, отражают полученные автором новые научные результаты.

В первой главе «Обзор литературы» автором освещены вопросы, касающиеся ботанических, геномных и транскриптомных особенностей зерновых культур, современных данных о последовательностях геномов пшеницы и тритикале, приведена подробная информация о классификации и характеристике глютенинов, а также их влиянии на хлебопекарные качества; подробно описаны значение и функции длинных некодирующих РНК. Обзор литературы изложен достаточно полно и охватывает различные аспекты современного состояния изучаемой проблемы, написан понятным, легко воспринимаемым языком.

Глава «Материалы и методы исследования» включает описание отечественного и зарубежного растительного материала, использованного при выполнении данной диссертационной работы, и содержит описание использованных методик. Для решения поставленных в работе задач автором были проведены экстракция нуклеиновых кислот с использованием стандартных и адаптированных для данного исследования методик, дизайн олигонуклеотидов для ПЦР-анализа и секвенирования ампликонов, подготовка библиотек для секвенирования и биоинформатический анализ.

Глава «Результаты исследования» содержит изложение фактических данных по аллельному разнообразию глютенин-кодирующих генов пшеницы и тритикале,

полученные с помощью целевого нанопорового секвенирования. Описываются структурные вариации, которые подтверждены с помощью ПЦР и секвенирования в процессе сопоставления полученных ридов с референсными последовательностями из базы данных, а также ранее неизвестный аллель глютеинин-кодирующего гена, который представляет интерес для функциональной характеристики. Изучено изменение статуса метилирования промоторной и кодирующей последовательностей глютеинин-кодирующих генов тритикале. Проведенный транскриптомный анализ развивающейся зерновки выявил высокий процент ранее неаннотированных генов в субгеномах A, B и R, которые в том числе представлены днРНК. Проведен анализ полиморфизма генов днРНК и идентификация различий между наборами генов, экспрессирующимися на разных этапах развития зерновки. Фактический материал хорошо иллюстрирован рисунками и таблицами.

В «Заключении» автор обобщает полученные результаты. Выводы основываются на фактически полученном автором материале, соответствуют поставленным задачам и отражают суть проведенных исследований.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы.

Сведения о полноте опубликованных научных трудов

Основные результаты диссертации опубликованы в иностранных и отечественных реферируемых изданиях и доложены на конференциях. По материалам работы выпущено 3 научные статьи, опубликованные в зарубежных изданиях, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus/WoS. Результаты исследований представлены в сборниках российских и международных научных конференций, а также получен один патент на изобретение.

Общие вопросы и замечания по работе

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 глюteniнах, 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.

Высказанные замечания не снижают научно-практическую ценность диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны на тему «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7.– Генетика (биологические науки) является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих важное значение для



биологической науки. В частности, 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 №842 от 24 сентября 2013 года, а ее автор, Полховская Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – Генетика.

Диссертационная работа Полховской Е.С. и отзыв были обсуждены и одобрены на заседании лаборатории генетики растений ИОГен РАН, протокол №2 от 24 октября 2024 г. Присутствовали 7 сотрудников, «за» - 7 человек, «против» и воздержавшихся нет.

Отзыв составлен заведующим лабораторией генетики растений, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика Александром Михайловичем Кудрявцевым.


Кудрявцев Александр Михайлович
«24» октября 2024 г.

Подпись Кудрявцева Александра Михайловича заверяю:

Ученый секретарь ИОГен РАН, д.б.н.  Горячева Ирина Игоревна
«24» октября 2024 г. 

Сведения о составителе отзыва:

Ученая степень: доктор биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика

Ученое звание: член-корреспондент РАН

Должность: заведующий лабораторией генетики растений

Организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук;

Адрес организации: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3;

Телефон организации: +7 (499) 135-62-13;

Факс: +7 (499) 132-89-62

Сайт организации: <https://www.iogen@vigg.ru>

e-mail: iogen@vigg.ru