

**Заключение экспертной комиссии диссертационного совета 24.1.218.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук**

от 12.09.2024 (двенадцатого сентября две тысячи двадцать четвертого года)  
(протокол № 8)

по принятию к защите диссертационной работы Полховской Екатерины Сергеевны на тему «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

**Председатель комиссии:** д.б.н., Кулуев Булат Рязяпович

**Члены комиссии:**

д.б.н., профессор, Хидиятова Ирина Михайловна

д.б.н., Бермишева Марина Алексеевна

Комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 рассмотрела документы диссертационной работы о принятии к защите диссертации младшего научного сотрудника лаборатории маркерной и геномной селекции растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) Полховской Екатерины Сергеевны «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

**Научный руководитель:** Соловьев Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, заместитель директора Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийского центра карантина растений» (ФГБУ ВНИИКР).

**КОМИССИЯ ПРИШЛА К СЛЕДУЮЩЕМУ ЗАКЛЮЧЕНИЮ:**

**1. Актуальность темы**

Зерновка является важнейшим органом, обеспечивающим высокую ценность зерновых культур для питания людей, а её формирование является одним из ключевых и практически значимых биологических процессов. С помощью морфологических, гистологических и биохимических методов были описаны соответствующие изменения на разных стадиях развития зерновки. Однако динамика транскриптома в процессе развития зерновки остаётся малоизученной. Полученные данные об экспрессирующихся генах недостаточны для отражения полной информации об изменениях транскриптома на разных этапах развития зерновки. Геномная организация даже хорошо изученных глютенинов, вовлеченных в процесс развития зерновки, остается не полностью охарактеризована ввиду того, что их аллели могут различаться структурными вариациями, расположенными, как в кодирующей части гена, так и, что немаловажно, в промоторе. Направление исследований, связанное с оценкой аллельного полиморфизма известных генов и выявлением ранее неаннотированных генов, важно для понимания фундаментальных основ экспрессии генома в полиплоидных видах, влияния метилирования и роли днРНК в экспрессии генов. Привлечение и мониторинг расширенного списка новых генов в селекционный процесс позволят улучшить белковый

состав зерновки и повысить технологические, в том числе хлебопекарные качества зерновых культур.

Таким образом, данная диссертационная работа содержит большой комплекс исследований, который представляет информацию о полиморфизме генов глютеинов пшеницы и тритикале, статусе метилирования промоторной и кодирующей последовательностей генов запасных белков и его связи с экспрессией, а также идентификация ранее неаннотированных генов, экспрессирующихся в процессе развития зерновки.

## **2. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Определение темы диссертационной работы, цели и задач исследования проводились автором совместно с научным руководителем - д.б.н., профессором, профессором РАН Соловьевым А.А. Разработка методологических подходов к решению поставленных задач, непосредственное проведение экспериментов по идентификации аллельного состава генов глютеинов, транскриптомный анализ развивающейся зерновки, а также обработка и обсуждение полученных результатов, их оформление в виде научных публикаций и докладов проведены автором лично, либо при непосредственном участии. Подготовка рукописи настоящей диссертационной работы и автореферата проводилась лично автором.

## **3. Достоверность результатов проведенных исследований**

Объективность и достоверность полученных результатов подтверждены использованием современного научного оборудования с использованием общепринятых и адаптированных для данной работы методик, воспроизводимостью всех полученных в процессе исследования результатов, а также корреляцией с литературными данными и высоким рейтингом опубликованных научных работ. Выводы, сформулированные по результатам диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам.

Экспериментальные данные, полученные в ходе выполнения диссертационных исследований, были доложены и обсуждены на международных и российских конференциях и конкурсах, в том числе: 20-я Всероссийская конференция молодых учёных, посвященная памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2020); Международная научно-практическая конференция «Научное обеспечение технологического развития и повышения конкурентоспособности в пищевой и перерабатывающей промышленности» (Москва, 2020); конкурс работ молодых ученых ГБС РАН, посвященный году науки и технологий в России (I место, Москва, 2021); VII Всероссийский конкурс научно-исследовательских работ студентов и аспирантов «Наука будущего – наука молодых» (Новосибирск, 2022); I Международная молодежная конференция «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве» (Обнинск, 2022); Международная конференция «Генетика, биотехнология, селекция, семеноводство, технологии выращивания и переработки тритикале», посвященная 110-летию со дня рождения основателя ВНИИСБ академика Н.В. Турбина» (Москва, 2022); V Вавиловская международная конференция «Тритикале – культура будущего» к 85-летию У.К. Куркиева (Санкт-Петербург, 2022); II Международная молодежная конференция «Генетические и радиационные технологии в сельском хозяйстве» (Обнинск, 2023); XXIII-я научная конференция молодых ученых «ТРИТИКАЛЕ: генетика, биотехнология, селекция и семеноводство, технологии выращивания и переработки» (Москва, 2023); VII Международная научная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PLANTGEN 2023) (Казань, 2023); VIII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 300-летию российской науки и высшей школы (ВОГиС, Саратов, 2024).

#### 4. Научная новизна и практическая значимость

Впервые был проведен комплексный транскриптомный анализ с применением нанопорового секвенирования кДНК и РНК на ранней (10 dpa), средней (15 dpa) и поздней (20 dpa) стадиях развития зерновки тритикале. В результате было выявлено 7128 ранее неаннотированных генов в А, В и R геномах, на каждый из которых приходилось 2340, 2947, 1841 генов, соответственно. Среди ранее неаннотированных генов почти половина (3174) представлена днРНК, в то время как среди аннотированных их доля не превышает 5%. Это свидетельствует о том, что днРНК плохо аннотированы из-за высокого содержания повторяющихся элементов. Следовательно, данный эксперимент подчеркивает эффективность нанопорового секвенирования для поиска любых экспрессирующихся генов, как белок-кодирующих, так и не кодирующих генов.

Впервые на зерновых культурах применен метод Cas9-опосредованного нанопорового секвенирования (nCATS), а также получена уникальная информация о метилировании ДНК генов запасных белков. Эпигенетический анализ выявил, что гены глютеинов имеют значительно более высокую плотность метилирования цитозинов в кодирующей области по сравнению с промоторным регионом. Полученная глубина секвенирования была достаточной для обнаружения InDels, SNPs и гаплотипирования. Показано, что данный подход можно использовать в качестве перспективного инструмента для таргетного секвенирования целевых генов растений с большими и сложными геномами.

Был оптимизирован метод нанопорового секвенирования ампликонов (ONT Amplicon-Seq) для выявления аллельных вариаций в шести генах HMW-GS. Применение технологии ONT Amplicon-Seq дало возможность обнаружить SNPs, InDels, новые аллельные варианты, а также идентифицировать вариации как в кодирующих областях генов глютеинов, так и в их промоторах, что невозможно осуществить при использовании стандартного метода SDS-PAGE. Используя данные секвенирования, был выявлен ранее неизвестный аллель (*Glu-Ax1-T*) гена *Glu-1Ax*, который представляет интерес для функциональной характеристики.

#### 5. Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По теме диссертационной работы было выпущено 3 научные статьи, опубликованные в зарубежных изданиях, которые входят в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus/WoS, 11 работ в сборниках российских и международных научных конференций, а также получен один патент на изобретение.

##### Научные статьи:

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

#### 6. Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертационное исследование Полховской Екатерины Сергеевны соответствует паспорту научной специальности 1.5.7. - Генетика, охватывающей направления (2. Геномы, их структура и функция; 7. Структурная и функциональная геномика. Эволюционная геномика; 8. Эпигенетика: эпигеном/эпипротеом/эпитранскриптом; 10. Молекулярно-генетические механизмы основных биологических процессов; 16. Генетическая/молекулярно-генетическая биоинформатика и методы многомерного

анализа; 17. Частная генетика микроорганизмов, растений и животных; 25. Прикладные аспекты генетики и др.).

#### **7. Ценность научных работ соискателя.**

В результате проведенных исследований был существенно расширен список известных генов пшеницы и тритикале, которые экспрессируются в процессе развития зерновки. Идентифицированные новые гены могут быть использованы для дальнейшего функционального анализа, что позволит глубже изучить молекулярные механизмы развивающейся зерновки. Полученные результаты дают новые знания об аллельном полиморфизме известных генов запасных белков и о способности новых генов кодировать белок. Включение их в селекционный процесс позволит улучшить белковый состав зерновки тритикале и пшеницы, а также повысить их технологические качества.

#### **8. Научная зрелость соискателя**

Полховская Е.С. выполнила большой объем экспериментальной и теоретической работы по изучению транскриптома развивающейся зерновки и полиморфизма генов глютеинов пшеницы и тритикале. При непосредственном участии Полховской Е.С. были выполнены все этапы экспериментальных исследований, а также обработка, анализ, и, что немаловажно, оформление полученных результатов в виде рукописей, опубликованных в высокорейтинговых научных изданиях. Полховская Е.С. показала себя как целеустремленный, квалифицированный, инициативный и заинтересованный исследователь, владеющий большим количеством современных научных методов, применяемых в биологических и генетических экспериментах.

#### **9. Проверка диссертации на заимствование материала без ссылки на авторов**

В тексте диссертации соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов и отдельных результатов, также отмечает полученные лично и (или) в соавторстве результаты, что соответствует п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. Итоговая оценка оригинальности по системе проверки использования заимствованного материала без ссылки на автора составила 93,64 % (заключение экспертной комиссии и автоматический отчет прилагаются).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Экспертная комиссия единогласно решила, что диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки) представляет собой научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям п.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, отмечено отсутствие в диссертации заимствованного материала без ссылок на авторов или источники заимствования. Диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны «Структурно-транскриптомный анализ генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования» может быть рекомендована к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01, по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Экспертная комиссия диссертационного совета 24.1.218.01 единогласно решила:

**Рекомендовать** представляемую диссертацию Полховской Екатерины Сергеевны к официальной защите на Диссертационном совете 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

**Утвердить официальных оппонентов**, обратив внимание на их научные публикации:

**Гончарова Николая Петровича** – доктора биологических наук, академика РАН, главного научного сотрудника сектора генетики пшениц Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10), тел.: +7 (383) 363-49-63\*1212, личный e-mail: gonch@bionet.nsc.ru, сайт: <https://www.icgbio.ru/>.

**Казакову Елизавету Александровну** – кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории молекулярно-клеточных основ сельскохозяйственной радиобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (249035, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, д. 1, корп. 1), тел.: +7 (484) 399-69-54, личный e-mail: elisabethafeb19@gmail.com, сайт: <https://rirae.ru/>.

**Утвердить ведущую организацию**, обратив внимание на то, что одно из основных направлений научно-исследовательской деятельности структурного подразделения, где будет проходить обсуждение, соответствует тематике диссертации соискателя:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ФГБУН ИОГен РАН), 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, ГСП-1, тел.: +7 (499) 135-62-13, e-mail: iogen@vigg.ru, сайт: <https://www.vigg.ru/>, исполняющий обязанности директора, д.б.н. Мисюрин Андрей Витальевич.

**Председатель экспертной комиссии Диссертационного совета 24.1.218.01 при Уфимском федеральном исследовательском центре Российской академии наук:**

д.б.н., Кулуев Булат Разяпович (по специальности 1.5.3. Молекулярная биология)



**Члены комиссии:**

д.б.н., профессор, Хидиятова Ирина Михайловна (по специальности 1.5.7. Генетика)



д.б.н., Бермишева Марина Алексеевна (по специальности 1.5.7. Генетика)




Председатель диссертационного  
совета 24.1.218.01,  
д.б.н., профессор, член-корр. РАО


 /Хуснутдинова Эльза Камилевна/

Заместитель председателя  
Диссертационного совета 24.1.218.01,  
д.б.н., доцент



 /Карунас Александра Станислововна/

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
24.1.218.01, д.б.н., доцент

 /Корытина Гульназ Фаритовна/

Дата: 12.09.2024 (двенадцатое сентября две тысячи двадцать четвёртого года)