

ОТЗЫВ

официального оппонента, 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» Казаковой Елизаветы Александровны 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 аннотации, характеристике и структурно-транскриптомному анализу генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся в процессе развития зерновки, с помощью нанопорового секвенирования. Данная тематика исследования является важной и актуальной, так как известно, что зерновка представляет собой важнейший орган злаковых растений, обеспечивающий их высокую ценность для питания людей, при этом гены, вовлечённые в развитие и формирование зерновки злаковых, динамика их транскрипции и полиморфизм среди существующих сортов остаются малоизученными. Также на сегодняшний день полученных данных об экспрессирующихся генах недостаточно для отражения полной информации об изменениях транскриптома на разных этапах развития зерновки. В связи с этим для выявления наиболее широкого набора экспрессируемых генов, связанных с ключевыми процессами, которые определяют развитие зерновки, и изучения структурных особенностей генов злаковых важно проведение исследований в различных временных точках с применением технологий секвенирования, основанных на длинных ридах. Такой подход с использованием секвенаторов третьего поколения поможет получить новые сведения о генетических основах развития зерновки (в частности, идентифицировать ранее неаннотированные белок-кодирующие гены и гены длинных некодирующих РНК), учитывая высокую динамичность транскрипционного ландшафта зерновки, а также сложность генома злаковых. Востребованным направлением работы также является адаптация и сравнение методов целевого высокопроизводительного нанопорового секвенирования полноразмерных последовательностей генов развития зерновки, что необходимо для анализа вариаций полноразмерных генов HMW-GS, кодирующих высокомолекулярные белки глютенины, оказывающие влияние на качественные характеристики муки. Таким образом, актуальность и востребованность диссертационного исследования Полховской Екатерины Сергеевны, не вызывает сомнений.

Научная новизна, теоретическая и научно-практическая значимость исследования. В работе Полховской Е.С. впервые выполнен комплексный транскриптомный анализ с использованием секвенирования длинными ридами кДНК и РНК на разных стадиях развития зерновки и идентифицированы ранее неаннотированные гены. Используя Cas9-опосредованное нанопоровое секвенирование выявлены структурные вариации (InDels и SNPs) полноразмерных генов высокомолекулярных глютеинов и впервые установлен профиль распределения метилирования цитозина по всей длине генов глютеинов, включая промоторную область. Показано, что данные гены имеют существенное метилирование в кодирующей области. Был впервые оптимизирован метод нанопорового секвенирования ампликонов (ONT Amplicon-Seq) для выявления аллельных вариаций в шести генах HMW-GS.

Теоретическая и практическая значимость обусловлена результатами проведенных исследований, которые значительно расширили список известных генов пшеницы и тритикале, экспрессирующихся на разных стадиях развития зерновки. Результаты работы позволили получить новые фундаментальные знания о понимании молекулярных механизмов, вовлеченных в развитие зерновки. Практическое применение полученных знаний не вызывает сомнения, так как идентифицированные гены могут быть использованы для поиска мишеней для маркер-опосредованной селекции и ускоренного отбора ценных генотипов с улучшенными хлебопекарными качествами. Важным практическим преимуществом работы является использование метода ONT Amplicon-Seq, который применим в практической селекции для идентификации известных и выявления новых аллелей целевых генов в обширном генетическом разнообразии тритикале и пшеницы, а также других видов с большими и сложными геномами.

Новизна результатов, представленных в диссертационном исследовании, также подтверждается получением патента № 2785924 С1 от 15.12.2022 г. «Способы одновременного нанопорового секвенирования полных последовательностей значимых генов твердой пшеницы».

Тема диссертации соответствует паспорту заявленной научной специальности
1.5.7 Генетика (биологические науки) (пункты: 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, охватывая проблемы оценки полиморфизма генов глютеинов яровой тритикале, изучения изменения их статуса метилирования и его связи с экспрессией, идентификации ранее неаннотированных генов, экспрессирующихся в процессе развития зерновки.

Структура оформление диссертации и автореферата. Диссертация Полховской Е.С. написана в классическом академическом стиле, изложена на 145 страницах, состоит из следующих разделов: «Введение», глава 1 «Обзор литературы», глава 2 «Материалы и методы исследования», глава 3 «Результаты исследования», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Также представлен список сокращений и приложение. Список использованной литературы включает 271 источник, в том числе 254 – на иностранных языках. Текст содержит 11 таблиц, 30 рисунков.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, степень разработанности проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, отражены новизна, теоретическое и практическое значение полученных результатов, описаны методология и методы исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, представлены личный вклад соискателя, степень достоверности работы, информация по апробации работы и научных публикациях по материалам диссертации, а также объём и структура работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы, где приведены сведения о происхождении и биологических особенностях тритикале, селекционно-генетических аспектах качества зерна тритикале, 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 о секвенировании целевых последовательностей.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» автор описала современные методические подходы, используемые для решения поставленных задач диссертационного исследования.

В главе 3 «Результаты исследования» приводятся полученные автором научные результаты. Раздел содержит результаты Cas9-опосредованного нанопорового секвенирования (nCATS) генов высокомолекулярных глютеинов, секвенирования и анализа вариабельности генов высокомолекулярных глютеинов методом Nanopore Amplicon-seq, анализа транскриптома зерновок тритикале с помощью Нанопорового секвенирования. Глава довольно хорошо иллюстрирована.

В заключении приводятся краткие итоги исследования.

Сформулированные выводы основаны на полученных соискателем экспериментальных данных, полностью отражают содержание диссертационного исследования и отвечают на поставленные в работе задачи.

Автореферат по структуре и содержанию отражает представленную диссертацию и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. Выносимые на защиту основные положения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны.

Достоверность, обоснованность и апробация результатов исследования. На сертифицированном оборудовании с применением методов, соответствующих современным стандартам и общемировым требованиям, автором проведён большой объём экспериментальных исследований, которые отличаются высоким уровнем чувствительности и объективности, что указывает на достоверность полученных результатов работы. Обработка данных была выполнена с использованием программного обеспечения, необходимого для проведения биоинформатического и статистического анализа экспериментальных данных. Выводы соответствуют цели и задачам исследования.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них 3 статьи в изданиях первого квартиля, индексируемых в международных базах данных.

Результаты исследования были представлены и обсуждены на международных и российских конференциях и конкурсах.

Таким образом, полученные Полховской Е.С. научные результаты и выводы, сформулированные на их основе, являются достоверными и обоснованными.

Общая оценка работы, замечания и вопросы. Диссертация Полховской Екатерины Сергеевны написана хорошим литературным языком, текст чёткий и понятный, хорошо выверенный, опечаток практически нет. Обзор литературы, описание всех стадий исследования и анализ их результатов свидетельствуют о высоком уровне теоретической и методической подготовленности автора диссертации.

Принципиальных замечаний к работе нет. Хотелось бы услышать комментарии автора по поводу следующих соображений:

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 транскриптомные 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?

Приведённые замечания и комментарии не влияют на безусловно положительную оценку работы, не умаляют её значимости и не влияют на выводы и защищаемые положения.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Полховской Екатерины Сергеевны «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 завершённой, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для генетики растений. Работа выполнена соискателем на высоком методическом уровне. Диссертационное исследование по актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, значимости результатов, полноте изложения, обоснованности и достоверности

выводов полностью 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 её автор — Полховская Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Официальный оппонент:

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»



Казакова Елизавета Александровна

«16» октября 2024 г.

Адрес: 249035 Россия, Калужская область, г. Обнинск, Киевское шоссе, д. 1, корп. 1; e-mail: elisabethafeb19@gmail.com

Согласна на сбор, обработку, хранение и передачу моих персональных данных при работе диссертационного совета 24.1.218.01 по диссертационной работе 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).

Подпись Казаковой Елизаветы Александровны заверяю:

кандидат биологических наук,
заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт» – ВНИИРАЭ



/Шубина О.А./