

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, академика РАН

Гончарова Николая Петровича

**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 Е.С. посвящена важному для исследования процессу злаковых культур – формированию зерновки – плода злаков, который характеризуется высокой сложностью и динамичностью. Транскриптом растения имеет очень динамичную природу, со многими генами, экспрессируемыми в определенных пространственно-временных условиях. Экспрессия отдельных транскриптов может различаться даже между временными точками, разделенными несколькими минутами. Ввиду того, что идентификация генов, экспрессируемых в процессе развития зерновки, напрямую зависит от ряда факторов, таких как глубина секвенирования, количество образцов, используемых для выделения РНК, технология секвенирования, качество сборки генома и т.д., анализ данных генов является интересной и важной научной задачей. Для лучшего понимания транскрипционного ландшафта зерновки необходимо применять технологии секвенирования, основанные на длинных ридах, которые позволяют выявить наиболее широкий набор экспрессируемых генов. Не смотря на современные подходы, геномная организация даже хорошо изученных запасных белков пшеницы - глютеинов остается недостаточно полно охарактеризована в связи с тем, что аллели, их контролирующие, могут различаться структурными вариациями, расположенными как в кодирующей части гена, так и в его промоторе. Поэтому назрела необходимость оптимизации новых методов, таких как

секвенирование целевых генов, ранее не были исследованы у зерновых культур. В связи с этим, в диссертационной работе автором был проведен комплексный транскриптомный анализ развивающейся зерновки тритикале (перспективной для сельского хозяйства рукотворной культуры) с помощью нанопорового секвенирования и впервые применены подходы целевого секвенирования (nCATS и ONT Amplicon-seq) генов глютеинов у этой культуры.

Научная новизна исследования и практическая значимость. Для характеристики полноразмерных последовательностей HMW-GS были оптимизированы и применены два метода нанопорового секвенирования (nCATS и Amplicon-seq). Благодаря Cas9-опосредованному нанопоровому секвенированию (nCATS) впервые для генов глютеинов удалось получить уникальную информацию о метилировании ДНК. Эпигенетическое профилирование целевых генов способствует решению ключевых задач, начиная с разработки маркеров для селекционных программ и заканчивая изучением механизмов регуляции экспрессии генов. Для работы с большими коллекциями был оптимизирован метод целевого секвенирования, основанный на ПЦР-амплификации (ONT Amplicon-seq), который позволяет за короткое время получить необходимое для оценки аллельных вариантов генов запасных белков количество данных. Применяя данный подход, диссертанту, помимо структурных вариаций, удалось обнаружить ранее неизвестный аллель *Glu-Ax1-T*. Транскриптомный анализ тритикале предоставляет ценную информацию для улучшения аннотации генома, выяснения функциональных характеристик развивающейся зерновки и поиска новых целей для анализа GWAS.

Обоснованность и достоверность результатов.

Диссертационная работа Полховской Е.С. проведена на высоком методическом уровне и выполнена с применением самых современных методов генетики. Автором успешно применены классические молекулярно-генетические методы работы, в том числе выделение нуклеиновых кислот из

проростков и из зерновки с использованием общепринятых и адаптированных для данной работы протоколов, дизайн олигонуклеотидов для анализа коллекций пшеницы и тритикале с помощью методов ПЦР, подготовка библиотек для секвенирования. Основным методом, применяемым в данном исследовании, стала высокопроизводительная технология – нанопоровое секвенирование РНК и ДНК. В работе выигрышно используются современные методы исследования, основанные на третьем поколении секвенирования (нанопорового секвенирования), позволяющим делать очень длинные чтения, относительно предыдущих методов. В данном случае автор хорошо пользуется всеми плюсами выбранного метода (сюда относится исследование профиля метилирования генов и исследование транскриптома растений), а также хорошо обосновывает выбор метода, так как гены глютелинов содержат много повторов, что плохо читается Сэнгером или платформой Illumina. Все это позволяет получить автору хорошие результаты, в том числе установить новый аллельный вариант гена *Glu-1Ax*, впервые описать профиль метилирования кодирующей части генов *Glu*. Полученные данные статистически достоверны и результаты обоснованы.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов.

По материалам диссертационной работы опубликовано достаточное число научных работ, в том числе 3 публикации в изданиях, входящих в перечень ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и индексируемых в международных базах WoS, Scopus, PubMed. Автором получен один патент на изобретение.

Структура и содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа Полховской Е.С. изложена на 145 страницах (114 стр. без списка литературы и приложений) и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, описания полученных экспериментальных данных, заключения, выводов и списка использованной литературы, включающего в себя 271 источник (из них 254 на иностранных языках). В работе 11 таблиц, 30 рисунков и 3 приложения.

Во Введении (с. 8–17) диссертантом обоснована актуальность исследования, его новизна и практическая значимость, показаны цель исследования и задачи, выделены резюмирующие ключевые положения диссертационной работы, а также все другие данные, требуемые для этого раздела диссертации.

В первой главе диссертационной работы «Обзор литературы» (с. 18 – 52) дано подробное описание ботанических особенностей и селекционно-генетических аспектов качества зерна пшеницы и тритикале, представлены данные о динамике транскриптома зерновки на разных стадиях ее развития. Подробно изложены данные о новейших методах изучения генетического разнообразия и анализа генома, отмечены проблемы, связанные с секвенированием генов у зерновых культур, а также показаны различные способы их решения.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» (с. 53 – 66) в разделе «Материалы для исследования» (с. 53) описывается использованный в работе растительный материал - сорта отечественной и зарубежной селекции. В 11 разделах «Методы исследования» (с. 53 – 66) дается подробное описание схемы эксперимента и использованных автором методов работ, а также описывается материально-техническая база, использованная в ходе проведения диссертационного исследования.

В основной главе диссертации «Результаты исследования» (с. 67 – 112) диссертантом подробно рассмотрены и всесторонне обсуждены полученные результаты. Глава имеет четкую структуру и разделена на 3 раздела, каждый из которых имеет свои подразделы. Вначале автором рассмотрены результаты по экспериментам, связанные с геномным анализом генов пшеницы и тритикале. Данный анализ включает в себя 2 раздела (с. 67 – 93), посвященные двум подходам целевого нанопорового секвенирования полноразмерных последовательностей генов глютеинов, а также проведен сравнительный анализ двух подходов. Третий раздел (с. 93 – 112) содержит результаты транскриптомного анализа развивающейся зерновки тритикале.

В данном разделе приводятся снимки зерновок, отобранных для анализа, схема биоинформатического анализа поиска ранее неаннотированных генов тритикале, приведены гистограммы и диаграммы, на которых доказываются различия между наборов транскриптов на разных стадиях развития зерновки.

В Заключение (с. 113) диссертации автором подводится итог на основе рассмотрения совокупности всех полученных данных проведенных исследований (в автореферате они представлены в резюмирующей форме).

Изложенные диссертантом выводы соответствует поставленным целям и задачам исследования.

Автореферат в краткой форме полно отражает материалы диссертационной работы и включает в себя обоснование актуальности, выносимые на защиту положения, основные результаты исследования (с приведением информативных схем и рисунков), заключение и список опубликованных работ. Он оформлен в соответствии с установленными стандартами, его содержание соответствует структуре, основным идеям, заключению и выводам, приведенным в диссертации.

Общие вопросы и замечания по работе. Положительно оценивая актуальность, новизну, научную обоснованность, значимость и завершенность диссертационной работы, следует обратить внимание на некоторые неточности и неаккуратность в оформлении:

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).

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

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(!?).

Встречаются также некоторые несогласования слов:

«транскриптов последовательности геномов» вместо «последовательностей» (с. 62).

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).

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

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).

Отмеченные выше недостатки не снижают общей научной и практической значимости работы.

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 биологии, в целом, в области геномной и транскриптомной характеристик зерновых культур, в частности. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-11, 13, 14, установленным «Положением о присуждении

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.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (специальность 03.00.15 – Генетика), академик РАН, главный научный сотрудник сектора генетики пшениц ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»



Гончаров Николай Петрович

«17» октября 2024 г.

Подпись Гончарова Николая Петровича заверяю:
ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, с.б.н.



Орлова Г.В.

Данные оппонента:

Место работы: 630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10, Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН);
Должность: главный научный сотрудник сектора генетики пшениц ИЦиГ СО РАН; **Телефон организации:** +7 (383) 363-49-63 **Сайт организации:** <https://www.icgbio.ru/> **e-mail:** gonch@bionet.nsc.ru

Согласен 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)