

Отзыв на автореферат диссертационной работы Альберта Е.В. «Изучение мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с изменением пролиферативной активности апикальной меристемы побега» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 генетика.

Представленная работа посвящена изучению генетической регуляции развития растений. Несмотря на большой прогресс, произошедший в этой области в последние годы, многие аспекты процессов развития остаются неясными, что делает выбранную тему актуальной. Работа Евгения Владимировича, является продолжением работ группы профессора Татьяны Анатольевны Ежовой (см., например, автореферат докторской диссертации Кавай-Оол У.Н., 2011) и сконцентрирована на изучении системы генетического контроля регуляции меристематической активности с использованием мутантов по двум генам *TOP1a* (мутант *fas-5*) и *NANA*. Первый из генов хорошо изучен с использованием большого числа подходов, см., например, работы Takahashi et al., 2002, Liu et al., 2014 и Dinh et al., 2014, изучение второго проводила только данная группа.

В ходе представленной работы было проведено анализ нескольких двойных мутантов изучаемых генов с известными генами, регулирующими меристематическую активность. Первое, что бросается в глаза при прочтении автореферата – использование диссертантом только классического генетического метода в сочетании с морфологическим анализом. При этом последний проведен крайне небрежно. Так, например, для сравнения средних используется критерий Стьюдента без проверки распределений на нормальность, несмотря на то, что многие из морфологических характеристик растений заведомо имеют другой тип распределения. Так же в методах не указано число образцов (растений, цветков) взятых в анализ. Только для некоторых из этих параметров можно найти соответствующие данные в приложении к диссертации. Таким образом, несмотря на достаточно большое различие некоторых из обсуждаемых в работе параметров, при выбранной форме представления данных достоверность этих различий вызывает некоторые сомнения. Аналогичные замечания касаются данных полученных при помощи сканирующей электронной микроскопии. Так на ряде микрофотографий (например, рисунки 1, 3 автореферата) не сделано никаких поясняющих знаков, что именно автор считает меристемами соцветия, а что латеральными меристемами, формирующими боковые цветки. При попытке разобраться в материале с обращением к тексту диссертации выясняется, что на ряде образцов интересные фрагменты просто выломаны (см., например, рис. 15Г диссертации). Помимо этого, из текста остается неясным проводилось ли изучение с помощью СЭМ только единичных образцов или в анализ их брали несколько для получения более полного описания.

Такая скудность используемых методов сказывается на тех выводах, которые делает автор и которые во многом видимо спекулятивны. Так, например, автор рассуждает о функции гена *TOP1a/FAS5* «Таким образом, ген *FAS5* поддерживает клетки АМП в недетерминированном состоянии и обеспечивает её целостность, формируя единую область экспрессии *WUS*». При этом никакого анализа областей экспрессии в работе не проведено (например, с использованием репортерных генов, гибридизации *in situ* или иными методами). Это тем более удивительно, что в группе, в которой выполнялась работа, некоторые из таких методов широко используются. Помимо этого, следует отметить, что влияние гена *TOP1a/FAS5* на *WUS* детально изучено в работе Liu et al., 2014, в связи с чем ценность и новизна данных экспериментов не очень ясна – как в автореферате, так и в диссертации нет четкого указания на то, что именно автором сделано расширяющего

представления об этом взаимодействии и насколько обоснованы такие дополнения. В той же работе - Liu et al., 2014 - так же дано хорошее объяснение плейотропному проявлению мутантов по гену *TOP1a/FAS5*, прежде всего на уровне регуляции активности генов.

Аналогичное замечание - о крайней спекулятивности, вследствие недостатка данных - относится и к ряду других выводов.

Так автор в выводе 3 утверждает, что «Ген *TOP1a* задерживает переход растений *A.thaliana* на репродуктивную стадию развития». При этом нигде в автореферате не сказано, что именно автор считает моментом (или свидетельством момента) перехода на репродуктивную стадию. Это может быть и развитие цветоноса до определенного размера, момент зацветания первого цветка, или активация в меристеме таких генов как *LFY* или еще что-то, о чем автор представляет догадываться читателю самостоятельно. При попытке догадаться обнаруживается, что автор видимо имел в виду морфологический критерий, связанный с появлением цветоноса. При этом альтернативная гипотеза, о том, что переход к цветению (в терминах активации соответствующих элементов генетических сетей, прежде всего гена *LFY* или в терминах числа дней развития) происходит одновременно с диким типом (что, например, у экотипа *Col* происходит на 12-14 день от всходов), а вот скорость развития цветоноса у мутанта повышена (то есть ген влияет не на переход к цветению, а на скорость развития, в том числе на число образуемых листьев) не рассматривается, хотя она сочетается и с данными по взаимодействиям.

Опять-таки в качестве доказательства позитивного влияния гена *TOP1a/FAS5* на ген *LFY* при развитии цветка приводится несколько электронных микрофотографий. В рассуждениях при этом совершенно игнорируется фенотип апикальных цветков у одиночного мутанта *fas-5* (рисунок 20Г диссертации), при учете которого взаимодействие можно трактовать как аддитивное. При этом простой анализ экспрессии любым методом, даже таким как полуколичественный ПЦР позволил бы существенно сузить круг гипотез. Но такой очевидный и простой эксперимент по какой-то причине не был проведен.

Возможно, трудности с планированием экспериментов при изучении гена *TOP1a/FAS5* связаны с неверной локализацией этого гена в предыдущих работах группы. Так в докторской диссертации Кавай-Оол У.Н. местом локализации гена указывается 2 хромосома. Видимо работа по изучению мутанта *fas-5* планировалась исходя из предположения о достоверности этой информации. Однако после соотнесения фенотипа мутанта с конкретным геном (расположенным на 5 хромосоме), проведенное в представленной работе, вероятно следовало скорректировать план исследований по его изучению и дополнить его в соответствии с существующими литературными данными, даже если бы это привело к задержке представления диссертационной работы.

Замечания, касающиеся достаточно смелых выводов, относятся и к другому изучаемому гену. Так в обосновании новизны исследования автор пишет «Впервые показано, что ген *NA* начинает функционировать в апикальной меристеме побега при переходе растений на репродуктивную стадию, по-видимому, контролируя структурную перестройку апикальной меристемы». Непонятно, что автор имеет в виду под «начинает функционировать» и как было определено время начала функционирования? Что автор считает функционированием так же не определено (это может быть время активации транскрипции; трансляции; влияние на морфогенез и т.д.). С учетом того, что последовательность гена неизвестна, а ген охарактеризован только на основании доминантного мутанта, необходимо учитывать, что паттерн и время экспрессии гена могут

быть изменены по сравнению с диким типом, что существенно расширяет круг возможных гипотез.

К сожалению, на этом фоне остается только надеяться, что нечеткие или неверные формулировки, такие как «*Так как мутация *pa-D* проявляется уже на вегетативной стадии развития*» (мутация не может проявляться, а у мутанта могут происходить морфологические изменения относительно дикого типа на такой-то стадии развития) или «*высокопараллельного секвенирования ДНК*» (вместо высокопроизводительное параллельное секвенирование), а также ряд других, вызваны спешкой и небрежностью в подготовке текста.

Здесь следует отметить, что согласно положению о присуждении ученых степеней «Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук должна быть научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний». Из текста автореферата и диссертации остается неясным, какая именно задача решена. Зафиксировано несколько интересных фактов, например, участие гена *TOP1a* в регуляции фотопериодической реакции растений, что могло бы являться основой для начала выполнения диссертационной работы, но не ее результатом. Так же не ясна квалификация диссертанта, по непонятным причинам, полностью проигнорировавшим в своей работе современные молекулярно-генетические методы, которые могли бы позволить получить ответы на поставленные в диссертации вопросы или хотя бы приблизиться к ним.

Вместо того, чтобы провести полноценную работу по изучению выявленных фактов, или ограничиться в выводах результатами, полученными на морфологическом уровне, автор упорно делает молекулярно-генетические выводы на основании изучения морфологических данных. Такой подход был частично допустим в начале 90-х годов прошлого века, когда несколько классических систем, таких как ABC-модель определения типа органов цветка были разобраны подобным образом. При этом следует отметить, что авторы тех работ располагая существенно большим материалом, чем диссертант, практически не делали выводов о деталях молекулярных аспектов функционирования генов. Однако даже в этих, сравнительно простых моделях, был допущен ряд неточностей, что в последствии было показано с использованием большого комплекса методов. В настоящее время, спустя четверть века после пионерских работ в данной области, подобный отказ от современных методов выглядит по меньшей мере странно, особенно на фоне общей невнятности выводов и большого количества данных по одному из генов, представленных в мировой литературе.

В целом существующие недостатки работы вызывают некоторые сомнения в том, что представленная работа Е.В. Альберта соответствует уровню необходимому для присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 генетика.

Старший научный сотрудник кафедры
генетики биологического факультета МГУ
им. М.В. Ломоносова, к.б.н.



/Пенин А.А./

119234, Россия, Москва, Ленинские горы,
д. 1, стр. 12, к. 272. (биологический факультет,
кафедра генетики) тел. +7-495-939-05-67
alekseypenin@gmail.com

ПОДПИСЬ РУКИ ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ

14.05.2015