

ОТЗЫВ

официального оппонента Хадеевой Наталии Васильевны
на диссертационную работу АЛЬБЕРТА Евгения Владимировича
«Изучение мутантов *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. с изменением
пролиферативной активности апикальной меристемы побега»,
представленной на соискание степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика

Одним из сложнейших и интенсивно изучаемых в настоящее время направлений генетики растений является генетика развития. Вопрос о том, как развивается индивидуум в онтогенезе, как взаимодействуют гены в процессе индивидуального развития, как регулируется этот процесс и что влияет на дифференцировку тканей в организме, представляет большой интерес.

С развитием молекулярно-генетических методов исследования и расшифровкой геномов ряда растений и животных стали проясняться некоторые процессы, лежащие в основе реализации генетической информации в процессе развития. В настоящее время определение структурной организации генома растений является достаточно стандартной процедурой, в то время как функции большинства генов остаются при этом неизвестными. Поэтому изучение функциональной сущности генов, в том числе генов высших растений, и генетического контроля морфогенеза у растений представляет большой теоретический и практический интерес.

Для этой цели очень удобно использовать модельные растения, обладающие изученным геномом и большими коллекциями мутантных по морфологическим признакам линий и локализованными на молекулярно-генетической карте мутантными генами. К таким растениям относится и резушка Таля, или арабидопсис. Он является в своем роде дрозофилой молекулярной генетики, поскольку его геном обладает уникальными свойствами и достаточно хорошо изучен генетически. Благодаря небольшому геному, короткому жизненному циклу, высокой плодовитости, самоопылению, малому числу групп сцепления ($2n=10$) и миниатюрности это растение стало главным объектом в молекулярно-биологических и биохимических

исследованиях растений. Большое количество уникальных последовательностей в его геноме дает возможность получать значительное количество мутаций, затрагивающих морфологические или физиологические признаки, что удобно для проведения дальнейшего генетического анализа. В результате исследования морфологических мутантов арабидопсиса сейчас созданы первые генетические модели эмбрионального развития, роста междоузлий, индукции цветения и морфогенеза цветка. Однако, эти модели еще далеко не полные, необходим дальнейший поиск и изучение новых генов и мутантов.

Представленная к защите работа Е.В.Альберта является продолжением серии работ, проводимых группой Т.А.Ежовой по изучению функций генов арабидопсиса, и посвящена проблемам изучения функции генов контроля процессов формирования апикальной меристемы стебля.

Изучение генетического контроля формирования апикальной меристемы побега имеет большое значение для понимания механизмов регуляции развития органов растений, гормональной регуляции, взаимодействия генов, участвующих в морфогенезе, с другими генами и генетическими системами и, в конце концов, для управления развитием растения как *in vivo*, так и *in vitro*, в разработке биотехнологических методов культивирования растений. В связи с изложенным темой диссертационной работы Е.В.Альберта следует признать весьма актуальной.

Диссертационная работа написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов исследования, отдельной обширной главы обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста, включает многочисленные рисунки и таблицы, часть из которых вынесена в приложение. Список литературы включает 202 наименования, из которых, к сожалению, только 11 – отечественных авторов, остальные – иностранные. Возможно, это связано с меньшим количеством публикаций отечественных авторов по этой проблеме. Однако хочется отметить этот факт как недостаток,

присущий большинству наших исследователей. Думаю, при желании можно было бы найти большее число ссылок на отечественные публикации.

Во введении автор кратко описывает изучаемую проблему, обосновывает актуальность и научную новизну проведенных исследований, четко формулирует цели и задачи. **Обзор литературы** занимает 52 страницы (примерно, одну треть) текста диссертации и состоит из 3 разделов. Первый посвящен описанию и характеристике ствольных клеток растений, второй и третий – генетической регуляции возникновения изменений в онтогенезе, взаимодействию генов, вовлеченных в процесс развития апикальной меристемы побега и флоральной апикальной меристемы и систем генов-регуляторов поддержания активности и гомеостаза апикальной меристемы, а также изменениям апикальной меристемы побега в постэмбриональный период.

Анализируемая автором литература охватывает значительный период времени – с конца 1980 г.г. по настоящее время. Евгением Владимировичем проанализирован и логически построен огромный фактический материал, что демонстрирует эрудицию автора. Фактические данные сгруппированы в схемы, облегчающие восприятие материала. Обзор литературы, как и вся диссертация в целом, отлично оформлена и дополнена фотографиями и схемами.

На основании анализа литературных данных и собственных исследований группы Татьяны Анатольевны автор выбирает конкретные мутанты и гены для анализа, формулирует цель и задачи работы по изучению контроля над пролиферативной активностью клеток апикальной меристемы побега арабидопсиса со стороны генов фасциата (FAS5) и *nan-D*.

Раздел «Материалы и методы» Е.В.Альбертом написан очень кратко и занимает всего 4 страницы. В нем, в основном, описаны все методы, использованные при выполнении работы: выращивание растений в почвенной культуре, состав среды для асептической культуры, методы морфометрического анализа материала, методы генетического анализа, картирования и статистической обработки. Кратко изложена методика подготовки растительного материала для сканирующей электронной микроскопии. Описаны

выбранные пары мутантных линий и некоторые принципы их выбора для получения двойных мутантов с целью анализа генных взаимодействий. Пожалуй, последняя часть чересчур кратка и, в отличие от автора, по моему мнению, не всегда очевидна для менее сведущего читателя.

Кроме того, в разделе о подготовке материала для картирования мутации *fas5* упоминается метод высокопараллельного секвенирования нового поколения, о котором более не приводится никаких сведений и ссылок, что можно отнести к недостаткам представленной работы. Раздел показывает, что автор владеет методами классической генетики – гибридологическим анализом, методами анализа и статистической обработки результатов, компьютерными методиками.

Глава собственных экспериментов занимает 86 страниц. Логическая схема собственных исследований согласуется с логической схемой построения обзора литературы.

В первом разделе диссертант детально описывает эффект мутации *fas5* на морфологические и физиологические аспекты развития мутантного растения в онтогенезе: изменение размеров и морфологии апикальной меристемы за счет образования крупных клеток и формирования многочисленных слившихся «дочерних» меристем, развитие очагов эктопической пролиферации на поверхности органов, изменение времени образования цветоноса, увеличение количества цветков, нарушение филлотаксиса, спиральности развития органов и сближение узлов, ветвление стебля за счет деления апикальной меристемы на несколько частей и т.д. Интересно, что сильный уровень фасциаций обнаруживается не у всех, а лишь у 10 - 15% растений и не зависит от степени фасцированности родительского растения.

Отдельно описываются наблюдаемые нарушения развития побега у данного мутанта в условиях короткого дня и выдвигается предположение о нарушении механизмов, регулирующих ответ организма растения на световые стимулы, в том числе продолжительность фотопериода. Из текста не совсем

понятно, с чем связан выбор изучения влияния длины фотопериода на развитие этого мутанта.

Второй раздел собственных исследований посвящен детальному изучению взаимодействия гена *FAS5* с генами, контролирующими поддержание в активном состоянии меристемы побега, на основании анализа гибридов первого поколения от скрещивания с этими генами (*CLV1*, *CLV 2*, *CLV 3*) и изучению фенотипа двойных мутантов,

В третьем разделе изучается взаимодействие данной мутации с генами, контролирующими развитие и поддержание флоральной меристемы (генами *LFY*, *AP2*, *PI*).

Четвертый раздел собственных исследований посвящен генетическому картированию мутации *fas5*. Подтверждено отсутствие сцепления *fas5* с хромосомами I, III, IV. Анализ не выявил сцепления с маркерами *sty*, *as1* и *cer8*, которые находятся во II хромосоме, но обнаружено сцепление мутации *fas5* с V хромосомой. Локализация *fas5* на хромосоме V *A.thaliana* также подтверждается наличием сцепления мутации *fas5* с мутацией *lfy-10*. И только в этом разделе упоминается о проведенном совместно с группой А.А.Пенина картировании данной мутации методом высокопараллельного секвенирования, что позволило локализовать ген в районе 22-23 МБ 5 хромосомы и показать, что мутация *fas5* затрагивает ген *At5g55300* (*TOP1*, *TOP1ALFA*), кодирующий топоизомеразу I α .

Показано, что мутация представляет собой замену цитозина на тимин, ведущую к замене глутаминового кодона CAG на стоп-кодон UAG, что приводит к преждевременной терминации транскрипции и потере функционально значимого C-концевого домена топоизомеразы I.

В тексте указано, что данная часть работы была проведена в лаборатории профессора А.С.Кондрашова на факультете биоинженерии и биоинформатики. На мой взгляд, и краткое описание и ссылку на место проведения можно было бы перенести в методический раздел.

В этом разделе был проведен анализ структуры продукта гена *TOP1*, а также предполагаемых продуктов нескольких мутантных аллелей (*fas5*, *mgol-1*,

top1 α-1 и *mgol-4*) с использованием баз данных InterPro и сделаны выводы о том, что мутация *fas5* (как и остальные рассмотренные мутации) приводит к потере активного центра фермента, что позволяет отнести ее к нуль-аллелям.

Все многочисленные морфометрические данные обработаны статистически и подтверждены таблицами и фотографиями. На основании полученных результатов выдвигаются предположения о возможных механизмах регуляции взаимодействия этих генов.

Следует отметить внимательный и даже педантичный анализ различных морфологических и физиологических изменений мутантных растений, включающий такие признаки, как сравнительный анализ динамики выброса цветоноса, развития розеточных листьев и листьев других ярусов, образования цветков и т.д.

Большое впечатление производит огромный объем проведенной работы при анализе взаимодействия генов FAS5 и NA с другими генами, вовлеченными в поддержание пула стволовых клеток растения и регуляцию развития апикальной меристемы побега и цветка. Для этого были проведены многочисленные скрещивания и анализ потомства двойных мутантов.

Автором установлены новые функции гена TOP 1α. *A.thaliana* и стадия развития апикальной меристемы, на которой начинает функционировать ген NA, и что эти гены действуют по независимым регуляторным путям. Ген NA в представленной работе не был клонирован, и его молекулярная функция пока не выяснена. Тем не менее, автор сумел значительно углубить представления о его функции в организме, проследив за проявлением гена на всех стадиях онтогенеза.

Следует еще раз отметить, что результаты экспериментов наглядно проиллюстрированы с помощью информативных таблиц, рисунков и фотографий, дополнительно хорошая наглядная информация приведена в Приложении.

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 4 – в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки,

и 4 – в тезисах конференций. Основные положения диссертации отражены в автореферате.

В целом диссертант владеет современными методами исследования, успешно решил стоявшую перед ним задачу, продемонстрировал научную эрудицию, большое трудолюбие и творческий подход к исследованию.

Принципиальных замечаний к работе нет. К недостаткам, пожалуй, следует отнести не вполне очевидный выбор пар мутантов для скрещивания.

В заключение еще раз хочется подчеркнуть, что работа выполнена на высоком методическом уровне, хорошо документирована и иллюстрирована. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Результаты работы представляют как научный, так и практический интерес. В тексте диссертации и автореферата имеется некоторое количество опечаток. Однако указанные недостатки не умаляют ценности данной диссертационной работы. По своей актуальности и научной значимости представленная работа вполне соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор, Евгений Владимирович Альберт, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент:

Хадеева Наталия Васильевна

к.б.н., доцент

ведущий научный сотрудник

лаб. генетики растений Федерального

государственного бюджетного учреждения

науки Института общей генетики им. Н.И.

Вавилова Российской академии наук

(119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3, тел.

499-1356213, www.vigg.ru); E-mail: khadeeva@vigg.ru



Подпись
удостоверяю

Ученый секретарь ИОГен РАН
доктор биологических наук



О.А.Огаркова

22.04.2015