

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу  
**Симановского Сергея Анатольевича** на тему: «Мейотические мутации ржи *Secale cereal L.*: Анализ проявления и использование для изучения механизмов мейоза»,  
представленную в диссертационный совет Д.002.214.01 при Федеральном  
государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им.  
Н.И. Вавилова Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика

### Актуальность темы диссертационной работы

Использование мейотических мутантов является одним из самых эффективных способов изучения архитектуры и генетического контроля сложных процессов рекомбинации, обеспечивающих генетическую стабильность и разнообразие всех размножающихся половым путем эукариот. Большое количество мейотических мутантов, более 100, было выявлено у растений, таких как арабидопсис, кукуруза и рис, которые активно изучаются, о чем свидетельствует огромное количество публикаций в реферируемых международных журналах. В данной работе объектом исследований была уникальная коллекция спонтанных мейотических мутантов ржи, созданная на кафедре генетики Санкт-Петербургского государственного университета. Рожь является ценной сельскохозяйственной культурой и одновременно удобной моделью для изучения мейоза. Каскад сложных согласованных процессов в мейозе хорошо изучен на грибах, для которых известно 360 генов, контролирующих мейоз. Механизмы этих процессов у растений пока остаются слабо изученными. Поэтому актуальность работы Симановского С.А., посвященной исследованию мейотических мутантов ржи с использованием генетических, молекулярных и молекулярно-цитогенетических методов, не вызывает сомнений. Полученные диссертантом данные расширяют наши знания об архитектуре сложного нуклеопротеинового комплекса и динамике его формирования в профазе 1 мейоза. Результаты исследований и изученные мутантные формы также представляют интерес для селекционеров злаковых культур.

### Научная новизна

Диссертантом впервые проведен генетический анализ последовательных поколений мутанта *su11* и установлен тип наследования данной мутации –

моногенный и рецессивный. Впервые изучена динамика проявления мутации *sy11* с использованием световой и электронной микроскопии, и иммунофлуоресцентного анализа. Выявлено, что мутация *sy11* вызывает гетерологический синапсис хромосом в профазе I мейоза с максимум проявления нарушений в поздней зиготоне – средней пахитене. Проведенный иммунофлуоресцентный анализ мутантов *sy1* и *sy19*, ассиноптического мутанта *sy1* и гетерологического синапса *sy19*, выявил отсутствие нарушений в загрузке белков ASY1 и ZYP1, компонентов латеральных и центральных элементов синаптонемного комплекса (СК), соответственно. Данные результаты являются оригинальными и важными для выяснения причин нарушений, вызываемых этими мутациями и, в целом, понимании функции ASY1 и ZYP1 в сборке СК.

#### **Научная и практическая значимость результатов исследования**

Результаты анализа четырех спонтанных мейотических мутантов ржи *sy1*, *sy9*, *sy11* и *sy19*, полученные диссертантом с использованием как методов классической генетики и цитологии, так и методов молекулярной генетики и иммунофлуоресцентного анализа, вносят определенный вклад в понимание сложных процессов, происходящих в мейозе у растений. Полученные результаты расширяют наши знания о генетическом контроле мейоза, формировании и демонтаже СК у ржи.

**Результаты диссертации рекомендуются для использования** в научно-исследовательских лабораториях, занимающихся изучением кроссинговера, микро- и макроспорогенеза у растений, а также при чтении лекций и проведении спецкурсов в научно-образовательных учреждениях и университетах, в том числе РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

#### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Симоновского С.А. изложена на 123 страницах текста и включает 26 рисунков и 24 таблицы. Диссертация состоит из введения», обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, включающих четыре раздела, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, содержащего 167 источников, из них 34 – на русском языке, 131- на английском языке и 2 интернет ресурса.

Во введении диссертант дает краткое обоснование важности исследования мейоза, обосновывает актуальность темы своих исследований, описывает степень разработанности темы, формулирует цель и задачи работы и аргументирует ее научную и практическую значимость.

В главе 1 автором проведен обзор литературы, в котором подробно проведен анализ мейотических мутаций растений. Автор описывает известные мутации растений, затрагивающие дифференциацию мейоцитов, вступление в мейоз, образование когезинового комплекса, спаривание хромосом. Автором проведен анализ генов контролирующих мейоз. Подробно рассмотрены все этапы мейоза, начиная с механизмов активации и вовлеченных в нее генов, описывает белки когезинового комплекса растений в сравнении с подобными белками других эукариотических организмов и заканчивая сборкой синаптонемного комплекса. Текст иллюстрирован наглядными схемами. Особое внимание автор уделяет описанию Петергофской коллекции мейотических мутантов ржи.

В главе 2 «Материалы и методы» дается описание использованного в исследованиях растительного материала. Диссертант дает тщательное описание всех методик.

Глава 3 посвящена описанию результатов исследований и их обсуждению. Полученные автором результаты, а так же их интерпретация и обсуждение изложены по разделам в соответствии с этапами исследований и поставленными задачами. Первый раздел посвящен изучению наследования и проявления мейотической мутации *su11*. Изучение наследования мутации было проведено в трех последовательных поколениях (I<sub>6</sub>-I<sub>8</sub>) растения гетерозиготного по *su11* мутации. Тестирование мейотических фенотипов проведено по цитологическим показателям: анализ стадий мейоза в материнских клетках пыльцы. Анализ расщепления по мутации *su11* в потомствах самоопыленных гетерозигот позволил диссертанту сделать вывод о моногенном и рецессивном наследовании данной мутации. Проведен электронно-микроскопический анализ профазы I и было установлено нарушение синапса гомологов. Изучена динамика событий негомологичного синапса: средняя зиготена – поздняя зиготена – средняя пахитена – поздняя пахитена и ранняя диплотена. Данные обработаны статистически и сделаны выводы о максимуме нарушений в поздней зиготене – средней пахитене.

Во втором разделе проведена ревизия цитологического проявления мейотической мутации *su9*, которая является асинаптической мутацией ржи. Данные исследования автор обосновывает тем, что оставалась проблема

несоответствия картин в профазе 1 мейоза. Для отбора мейотических мутантов были использованы SSR-маркеры, сцепленные с *sy9* мутацией и проведен анализ расщепления в F<sub>3</sub> и F<sub>4</sub> по *sy9* мутации. Затем автором был проведен иммунофлуоресцентный анализ отобранных мутантов с использованием антител к белку ASY1. Автором выявлено наличие коротких фрагментов СК, которые не были выявлены в более ранних исследованиях (Федотова, 1988; Соснихина и др. 1998), что дало основание автору объяснить образование открытых бивалентов.

В третьем разделе диссертант описывает результаты иммунофлуоресцентного анализа распределения белков ASY1 и ZYP1 в мейоцитах мутантов *sy1* и *sy19*. Данные мутанты ржи были изучены ранее, и было установлено, что мутация *sy1* вызывает полный асинопсис и мутация *sy19* приводит к гетерологичному синапсису хромосом. Основанием для проведения исследований стала рабочая гипотеза о причинах дефекта синапсиса у этих мутантов, связанных с нарушением загрузки структурных белков синаптонемного комплекса. В результате проведенных исследований не было обнаружено различий в распределении белков ASY1 и ZYP1 у растений мутантов по сравнению с растениями дикого типа. Результаты исследований подтвердили ранее предложенную Михайловой Е.И. с соавторами (2010) модель загрузки белков ASY1 и ZYP1 у ржи, согласно которой загрузка ZYP1 происходит еще до начала синапсиса. Более того, интерпретируя полученные результаты в свете последних данных по формированию синаптонемного комплекса, свидетельствующих об участии в формировании центрального элемента помимо ZYP1 и других белков, диссертант предполагает наличие аналогичных белков у ржи, которые, возможно, дефектны у данных мутантов. Дальнейшие исследования протеома ржи, возможно, подтвердят данное предположение.

Несомненный интерес представляет результаты по сравнительному анализу деградации СК на стадии диплотены у растений дикого типа и мейотических мутантов *sy*, *lsy9*, *sy11* и *sy19*, описанные в четвертом заключительном разделе. Автором было выявлено, что у мутантов *sy11* и *sy9* происходит спирализация с последующей деградацией структур СК как и у растений дикого типа. А у мутантов *sy1* и *sy19* наблюдалась фрагментация неспаренных осей хромосом и отсутствие спирализации, что может указывать на различия как в составе осей хромосом так и в укладке/разборке латеральных элементов СК у изученных мутантов.

В Заключении диссертант обобщает и систематизирует полученные результаты. Приведена таблица с характеристикой изученных мутантных

форм. Диссертант подробно обсуждает изученные мутантные формы в сравнении с другими мейотическими мутантами ржи и известными мутациями, изученными на кукурузе, рисе и арабидопсисе. Автор обсуждает использование полученных результатов для составления более полной картины понимания процессов в мейозе и возможности практического применения мутантных форм гетерологичного синапса для расширения разнообразия исходного материала в селекционном процессе.

#### **Обоснованность и вероятность выводов**

Применение Симоновским С.А. сочетания методов классической генетики и цитологии с современными методами молекулярной генетики и цитогенетики подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных данных полученных диссертантом. Все выводы основаны на полученных автором экспериментальных данных и соответствуют поставленным задачам.

#### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Основные результаты опубликованы в двух статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и полностью отражают содержание диссертации. Исследования Симоновского С.А. были представлены на научных российских и международных конференциях.

#### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

Диссертация Симоновского С.А. написана четко и понятно, и оформлена в соответствии с рекомендациями ВАК. Автором проделаны большие по объему и интересные исследования. В целом, оцениваю работу положительно, но имеется ряд замечаний и пожеланий.

1. На стр. 72 автор делает вывод, что количество фрагментов СК, обнаруженных у мутанта *sy9*, соответствует количеству регистрируемых в метафазе I хиазм. Образование синаптонемного комплекса еще не значит, что произойдет событие кроссинговера, цитологическим проявлением которого являются хиазмы, тем более, что в данном случае речь идет о фрагментах СК. Правомернее был бы подсчет поздних рекомбинационных узелков, если они имелись, для сравнения с числом хиазм. Во многих работах было показано, что поздние рекомбинационные узелки коррелирует с числом хиазм.

2. На всех рисунках, демонстрирующих результаты иммунофлуоресцентного анализа, DAPIокрашенный хроматин, маскируется зеленой флуоресценцией, исходящей от мест посадки антител на белки ASY1 и ZYP1, что затрудняет оценку распределения этих белков на мейотических хромосомах. К каждому рисунку надо бы было дать соответствующее фото, сделанное только на DAPIфильтре.
3. Желательно было бы показать локализацию изучаемых мутантов на генетических и/или хромосомных картах.
4. Глава «Материал и методы», раздел 2.5.2, стр. 34 содержание компонентов ПЦР смеси дается в процентах, а нужно указывать молярную концентрацию.
5. На Рис.15А высокий фон затрудняет анализ результата – трудно увидеть фрагменты синаптонемных комплексов.

Однако указанные недостатки не снижают научно-практическую ценность данной диссертационной работы.

**Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует**

Диссертация Симоновского С.А. – самостоятельный законченный труд, имеющий научную и практическую ценность. Результаты диссертации представляют собой современный подход в анализе сложных биологических процессов, таких как мейоз, отвечающих за стабильность генома и биологическое разнообразие. Работа выполнена на высоком методическом уровне, поставленные диссертантом задачи полностью выполнены. Выводы диссертации соответствуют ее содержанию.

**Заключение**

Диссертационная работа Симоновского Сергея Анатольевича на тему: «Мейотические мутации ржи *Secale cereal* L.: Анализ проявления и использование для изучения механизмов мейоза» полностью отвечает критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г., и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее

