

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на работу Сергея Анатольевича СИМАНОВСКОГО «МЕЙОТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ РЖИ *Secale cereale* L.: АНАЛИЗ ПРОЯВЛЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ МЕЙОЗА», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика.

Подготовленная к защите диссертация Сергея Анатольевича СИМАНОВСКОГО изложена на 123 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану – включает Введение, главы «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы».

Во Введении диссертант констатирует, что тема диссертации - исследование генетического контроля мейоза, имеет как фундаментальное общенаучное, так и прикладное значение. По мнению диссертанта, общенаучная значимость этого направления исследований обусловлена тем, что исследуя влияние мутаций на протекание мейоза можно разделить всю последовательность цитологически регистрируемых картин и событий, наблюдаемых во время этого сложного процесса на отдельные генетически детерминированные этапы и затем изучить их генетические и молекулярные механизмы. Нет сомнений, что подход этот очень трудоемкий, доступный лишь высококвалифицированным специалистам, но пожалуй, не имеющий альтернативы. Актуальность предпринятого диссертантом исследования не вызывает никакого сомнения: генетический контроль мейоза у растений на настоящий момент исследован лишь фрагментарно. Более или менее основательно такие исследования проводились лишь на лабораторном объекте *Arabidopsis thaliana*, а из растений экономически важных только на кукурузе (И.Н. Голубовская и ее соавторы в США) и ржи (С.П. Соснихина и соавт. в России и Великобритании). Представленное к защите в качестве диссертации на соискание степени кандидата биологических наук исследование С.А. Симановского находится в русле этих работ, оно выполнено с привлечением нескольких современных методов молекулярной цитогенетики, в работе изучены особенности мейоза у новых мутаций и более углубленно исследованы несколько ранее

изучавшихся мутаций – все это делает работу актуальной и интересной для самых широких кругов исследователей генетического контроля клеточных процессов.

Диссертант так формулирует конкретные цели и задачи предпринятого исследования (стр. 31-32): Цель работы - анализ проявления мейотических мутаций ржи *Secale cereale* L. и использование их для изучения механизмов мейоза.

Конкретные задачи исследования: .

1. Изучить наследование у ржи новой мейотической мутации *sy11* и ее влияние на поведение хромосом в мейозе, в частности на синапсис.

2. С помощью методов иммуоцитохимии изучить особенности молекулярной организации осей мейотических хромосом у мутантов *sy1* и *sy19* в сравнении с растениями дикого типа, в частности, провести сравнительный иммунофлуоресцентный анализ распределения ортологов белков *AtASY1* и *AtZYP1* в мейоцитах ржи дикого типа и у мутантов *sy1* и *sy19*.

3. Изучить реорганизацию синаптонемных комплексов в поздней пахитене и ранней диплотене.

Все поставленные диссертантом задачи современны, все они касаются не исследованных или малоисследованных сторон структурной и функциональной организации хромосом у растений.

Принимая во внимание биологическую значимость процессов мейотической рекомбинации вообще и необходимость правильного понимания закономерностей рекомбинации и расхождения хромосом в мейозе у такого экономически важного объекта как рожь в частности, а также то, что рецензируемое исследование было проведено с использованием уникальной отечественной коллекции мейотических мутантов, научно-практическое значение представляемой к защите работы, ее актуальность и научная значимость не вызывают никаких сомнений.

Немаловажное значение имеет и то, что, как отмечает диссертант во Введении к диссертации (стр. 5), мейотические мутанты у таких растений как рожь и томаты уже сейчас используются в ряде европейских стран в селекции.

Очень хорошее впечатление производит Обзор литературы, который хорошо иллюстрирован. В обзоре литературы последовательно разбираются три темы - сначала дается общее описание мейоза и основные сведения о генетическом контроле событий мейоза у эукариот, затем более детально рассказывается о

мутациях, затрагивающих мейоз у растений, и, наконец, в 3-ей части обзора литературы подробно рассказывается о мейотических мутантов ржи, представленных в Петергофской генетической коллекции. Все, о чем рассказано в обзоре, рассказано на хорошем профессиональном уровне с необходимыми ссылками на авторитетные источники. Единственное замечание композиционного плана: выбирая темы, которые надо было раскрыть в Обзоре литературы, чтобы подвести читателя к адекватному восприятию сделанных в диссертации наблюдений и полученных результатов, следовало бы расширить параграф, который сейчас называется «Когезия сестринских хроматид и структура мейотических хромосом» где, собственно, говорится только о когезии сестринских хроматид и почти ничего о структуре мейотических хромосом. А, между тем, многие особенности структурной организации хромосом в профазе мейоза нетривиальны и не очень хорошо известны широким кругам генетиков, не занимающихся профессионально проблемами мейоза. Словом, я бы с интересом прочитал в «Обзоре литературы» к данной диссертации главу, примерно соответствующую по содержанию и иллюстративному материалу известному обзору Stack & Anderson «A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycle» *Chromosome Res.*, 2001. V. 9. P. 175-198, но, конечно, исполненную на уровне знаний 2016 года.

Раздел «Материал и методы» показывает, что диссертант уверенно владеет методами световой и электронной микроскопии, а также методами иммуноцитохимии и основами молекулярно-цитогенетического анализа. Глава написана подробно и интересно. Единственное замечание, которое может быть сделано по этому разделу: полное отсутствие ссылок на авторов использованных в работе методов - широко распространенная особенность диссертационных работ, выполненных в сильных, с глубокими экспериментальными традициями, лабораториях – обучение методам идет от старших-товарищей-предшественников, а не из статей и мануалов.

Описание проведенных диссертантом экспериментов и сделанных им наблюдений в глава «Результаты и обсуждение» выполнено на высоком профессиональном уровне. В диссертации дается детальный и обстоятельный анализ влияния разных мейотических мутаций на отдельные этапов мейоза.

Изучено наследование мутации *su11*. Результаты статистически обработаны. Микроскопический, ультраструктурный и иммунохимический разделы работы иллюстрированы микрофотографиями хорошего качества. Некоторые из микрофотографий просто просятся в учебник. Изложение, как правило, четкое и ясное, что позволяет оценить достоверность и доказательность полученных результатов, обоснованность сделанных диссертантом выводов. При этом очень удачно выбран необычный способ изложения материала: для каждой из исследуемых мутаций отдельная глава с описанием проведенного цикла исследований и отдельное обсуждение. Очень удобно читателю, разумно.

Не все объяснения описанных явлений в работе наблюдений мне понятны. Так на стр. 40 и стр. 50 говорится о том, что у мутанта *su11* в диакинезе 2% униваленты, 30% бивалентов несут 1 хиазму, 66% - 2 и 1% - 3 хиазмы, а в метафазе I (это следующая стадия мейоза) уже 16% (!) гомологов без хиазм, у 57% бивалентов 1 хиазма и у 27% - 2 хиазмы. Примечательно, что явление не наблюдается у растений дикого типа (стр. 40, 42). Диссертант не удивляется, он пишет, что при переходе от диакинеза к метафазе I происходит «потеря примерно трети хиазм» (стр. 50), или «при прохождении стадии диакинеза материнские клетки пыльцы теряют не менее 30% хиазм». В достоверность наблюдений верю, но требуется, чтобы была предложена рабочая гипотеза, некий возможный механизм, объясняющий наблюдения. Например, можно допустить, что часть из структур, которые определяются (фиксируются наблюдателем) в диакинезе как хиазмы в действительности такими не являются, а позже, в метафазе I мы видим уже только «истинные» хиазмы. Возможен и второй вариант: если принимать, что хиазма, это место, где прошел кроссинговер, и хиазмы иммобилизованы на хромосоме вследствие когезии сестринских хроматид, то уменьшение числа наблюдаемых хиазм можно объяснить только тем, что дистально от некоторых из субтеломерных хиазм при переходе от диакинеза к метафазе I у мутантов исчезает когезия сестринских хроматид – тогда число наблюдаемых хиазм может уменьшиться. Хотелось бы узнать мнение автора диссертации о возможных механизмах описанного им нетривиального явления.

Второе замечание касается интерпретации высокой частоты мостов в анафазе I и в анафазе II у мутантов *su11*. Фраза «Мосты... подтверждают наличие ошибок

хиазмообразования в профазе I» (стр. 50), как мне кажется, ничего не объясняет. Интересно, каких «ошибок». Высокая частота мостов в анафазе I (19% клеток !) и анафазе II (9% клеток) чаще всего есть индикатор высокой частоты транслокаций с образованием дицентриков. Рассматривал ли диссертант такую возможность? Между прочим, высокую частоту транслокаций у мутанта *sy11* можно допустить, если предположить, что наблюдаемые у этого мутанта аномалии СК (кресты, переключения синапсиса с хромосомы на хромосому) (стр. 48) есть следствие не негомологичного синапсиса, а синапсиса гомологичного, но в радикально перестроенном еще на предмейотической стадии кариотипе. Допускает ли диссертант такую возможность (экспериментально проверяемую с помощью хромосомо-специфичных зондов) ? Или, возможен такой вариант: негомологичный синапсис, сопровождающийся незаконной рекомбинацией с появлением дицентриков (если подтвердится, что синаптируют негомологичные хромосомы).

Если мутация *sy11* действительно связана с множественными переключениями синапсиса с одной пары хромосом на другую, как диссертант себе представляет механизм такого переключения ? В зиготене у мутанта, в отличие от мейоза дикого типа, множественные сайты инициации синапсиса, «законные» и «незаконные» и, вследствие этого, проблемы с «зиппингом»?

Исключительно интересны и новы результаты диссертанта, посвященные исследованию процессов разборки («демонтажа») синаптонемного комплекса. Описанные им явления асимметричной у гомологов спирализации деградирующих осевых элементов синаптонемного комплекса заслуживают самого пристального внимания и обсуждения в контексте особенностей структурной организации мейотических хромосом и механизмов укорочения («конденсации») гомологов в топологически сложно организованной структуре, где гомологи (в каждом по 2 хроматиды, каждая из которых состоит из тысяч суперскрученных петель), объединены друг с другом хиазмами, а между хиазмами претерпевшие кроссинговер хроматиды относительно осевого элемента СК соединены за счет когезинов и интерлокинга то с одной из родительских хромосом, то с другой. Возможно, очень важным является наблюдение, что у мутанта *sy19* в диплотене наблюдается только фрагментация латеральных элементов, но не спирализация. Но

не могло ли быть так, что взятые в анализ клетки на стадии диплотены (рис. 26) были теми клетками мутанта *sy19*, в которых все латеральные элементы СК были неспарены? Иными словами, не может ли быть так, что спирализация латеральных элементов СК при его демонтаже наблюдается только в межхиазменных районах хромосом и связана с топологическими их характеристиками?

Хочу подчеркнуть, что именно остроумный выбор объектов исследования - изучение мейоза у новых, ранее не исследованных или недостаточно исследованных мейотических мутантов ржи, у которых были нарушены разные этапы мейоза позволил диссертанту получить принципиально новые данные о механизмах отдельных этапов профазы мейоза злаков.

В целом, научная новизна выполненной С.А. Симановским работы не вызывает у меня никаких сомнений – все представленные данные оригинальны. Сделанные диссертантом заключения о строении и динамике поведения осей мейотических хромосом, особенно на заключительных этапах пахитены и в диплотене, имеют большое значение для всех исследователей мейоза.

Основные положения, вынесенные диссертантом на защиту, касающиеся наследования мутации *sy11* у ржи, редких актов спаривания гомологов в профазе мейоза I у мутантов *sy9*, представленные доказательства того, что у мутантов *sy1* и *sy19* не нарушена «загрузка» белков ASY1 и ZYP1 на хромосомы и представленные описания процессов разборки СК в диплотене, обоснованы представленными наблюдениями, микрофотографиями, квалифицированно проведенным обсуждением.

Выводы работы также обоснованы полученными результатами экспериментальной работы.

У меня есть только одно замечание редакторского плана: Список литературы к диссертации, к сожалению, оформлен по правилам рекомендованного ВАК печально известного «ГОСТ Р 7.0.11-2011 НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу», придуманному далекими от практики научных публикаций сотрудниками Российской государственной библиотекой, стандарту, исходно предназначенному для библиотек. Ранее ВАК допускал оформление диссертаций по вполне разумному «ГОСТ Р 7.0.5-2008.

Библиографическая ссылка», ГОСТУ, требования которого хорошо согласовались с международно принятыми правилами оформления ссылок в научных публикациях типа стандартов Modern Language Association (MLA), the American Chemical Society and the American Psychological Association (APA), Parenthetical (Harvard) referencing и т.п. ВАК РФ следовало бы разрешить диссертантам оформлять списки литературы по «ГОСТ Р 7.0.5-2008. Библиографическая ссылка».

Текст автореферата адекватно передает содержание работы. Результаты работы опубликованы в двух статьях в журналах из списка ВАК, они неоднократно докладывались на российских и международных симпозиумах, достаточно широко обсуждались и получили высокую оценку специалистов-цитогенетиков.

Сделанные мной в настоящем отзыве замечания дискуссионны и касаются лишь одной небольшой части этой, в целом очень интересной и очень технически сложной работы. Как квалификационная работа претендента на научное звание кандидата биологических наук по специальности «генетика», работа С.А. Симановского удовлетворяет самым жестким критериям, прилагаемым к кандидатским диссертациям: обзор литературы показывает, что диссертант хорошо ориентируется в теме исследования, проведенные эксперименты демонстрируют современную и разнообразную методическую подготовку и большое число цитогенетических методов, которыми владеет диссертант. Результаты оригинальны, интересны с общенаучной точки зрения, они раскрывают перед нами новые, в чем-то неожиданные стороны генетического контроля за событиями генетической рекомбинации, они хорошо иллюстрированы и, в целом, квалифицированно обсуждены.

Перед нами высокопрофессиональное цитогенетическое исследование, демонстрирующее разностороннюю профессиональную подготовку диссертанта, как генетика. Выводы работы вполне обоснованы,

Резюме: исследование Сергея Анатольевича СИМАНОВСКОГО «МЕЙОТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ РЖИ *Secale cereale* L.: АНАЛИЗ ПРОЯВЛЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ МЕЙОЗА», представленное к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика, является оригинальным научным

исследованием, характеризуется новизной и вносит заметный вклад в изучение молекулярных механизмов и клеточных процессов в мейозе у ржи. Работа обладает несомненной теоретической и практической значимостью, она соответствует критериям, установленным в пунктах 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Тем самым, Сергей Анатольевич Симановский заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, профессор

Заведующий лабораторией биосистематики и цитологии,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2

тел. 8-921-774-0792

avrodionov@mail.ru, avrodionov@binran.ru

Александр Викентьевич Родионов

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Санкт-Петербург
Российская Федерация