

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Филюшина Михаила Александровича на тему: «Анализ полиморфизма генома
чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*»,
представленную в диссертационный совет Д.002.214.01 при Федеральном
государственной бюджетном учреждении науки Институт общей генетики имени
Н.И. Вавилова Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертационная работа Филюшина М.А. посвящена изучению геномного полиморфизма чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium* методами мульти- и монолокусного анализа. Чеснок *Allium sativum* является второй по значимости луковичной культурой, но из-за сравнительно большого размера генома этот вид по сравнению с другими овощными культурами исследован слабо. Данный вид растения интересен также еще и тем, что он не образует семян и размножается вегетативно (клонами). Проводимые ранее исследования генетического разнообразия *Allium sativum* охватывали локальные популяции и сорта, при этом произрастающие на территории Российской Федерации генотипы чеснока не исследованы. Автором с использованием молекулярных методов анализа генома, таких как AFLP (Amplified fragment length polymorphism) и NBS-профайлинг (nucleotide-binding site), проанализированы 80 образцов чеснока различного эколого-географического происхождения из коллекции ВИР, в результате чего были определены уровни внутривидового полиморфизма и выявлены генотипы, отличающиеся от общей массы исследуемых образцов. Помимо этого, с помощью метода AFLP и анализа нуклеотидных последовательностей отдельных участков ядерного, хлоропластного и митохондриального генома проведен филогенетический анализ секции *Allium*, в результате чего автором выдвинуты предположения об общности происхождения цитоплазматических геномов для двух групп аллополиплоидных видов. Исследования организации и эволюции геномов растений имеют несомненное научное значение, так как способствуют сохранению генетического биоразнообразия и его эффективному использованию.

Диссертантом впервые определена и аннотирована полная нуклеотидная последовательность пластидного генома чеснока *Allium sativum*; впервые у четырех видов *Allium* идентифицированы и описаны гены, кодирующие белки с доменом холодового шока, показано существование у растений белков холодового шока с восемью цинковыми

пальцами, изучена экспрессия этих генов в вегетативных органах чеснока при нормальных температурных условиях и при холодовом стрессе (+4⁰С); впервые методом NBS-профайлинга исследован полиморфизм семейства R-генов у чеснока.

В этой связи, диссертационная работа Филюшина Михаила Александровича на тему: «Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*» является весьма актуальной и своевременной.

Диссертация написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 12 таблиц и 41 рисунок. Список цитируемой литературы включает 231 источник.

В «Введении» обосновывается актуальность работы, кратко рассматривается разработанность темы исследования, указывается научная новизна, теоретическая и практическая значимость, кратко описаны методы исследования.

В главе «Обзор литературы» проведен тщательный обзор литературы по теме исследований, изложена систематика, таксономическое строение и ботаническая характеристика рода *Allium*, кратко описаны используемые в работе методы молекулярного анализа генома растений.

В главе «Материалы и методы» приводятся сведения об используемой в работе коллекции образцов рода *Allium* и видов других родов порядка Asparagales, которая включает суммарно 158 образцов. Для каждого исследуемого образца в таблице отмечено, какими методами он изучался. Выделение ДНК и РНК из растительных тканей, амплификация последовательностей и клонирование проводились по стандартным методикам, поэтому подробно автором не описываются.

В главе «Результаты и обсуждение» аккуратно и подробно описаны полученные соискателем результаты. Глава состоит из пяти подглав, каждая из которых является описанием отдельной работы. В конце каждой подглавы приводится сравнение полученных данных с имеющимися литературными данными по тематике исследования. В «Заключении» приводится подробное описание проделанной работы, кратко суммируются полученные результаты. Выводы аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Большая часть работы выполнена диссертантом лично. Автор указывает в автореферате имена исследователей, которые выполняли определенные работы, результаты которых приведены в диссертации. Исследование Филюшина М.А. проведено на высоком научно-методическом уровне, с применением современных методов анализа

генома. Статистическая обработка результатов и оценка достоверности результатов проведена с использованием современных программ статистики. Диссертация завершается выводами, которые полностью отражают полученные результаты и соответствуют поставленным задачам. По результатам проведенной работы соискателем сделаны семь выводов. Все результаты работы тщательно проанализированы и, несомненно, подтверждают обоснованность выводов, сделанных Филошиным М.А. в диссертации.

Полученные соискателем в диссертационной работе результаты найдут применения в филогенетических и таксономических исследованиях рода *Allium*. Что касается практической значимости полученных соискателем результатов, то выявленные генотипы чеснока из коллекции ВИР, отличающиеся по набору AFLP-фрагментов и пулу R-генов, потенциально могут стать исходным материалом для селекции новых сортов чеснока.

Основные результаты диссертационной работы Филошина М.А. изложены в 4 научных статьях в рецензируемых научных журналах («Генетика», «Молекулярная биология», «Mitochondrial DNA. Part B Resources»), а также в опубликованных тезисах отечественных и международных конференций.

Однако к диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. В «Материалах и методах» отсутствуют последовательности праймеров для амплификации некодирующих участков ядерного и цитоплазматических геномов и разработанные автором праймеры для амплификации протяженных перекрывающихся фрагментов пластидного генома.

2. Не приведены графики плавления разработанных праймерных пар для ПЦР в реальном времени. Также, специфичность праймеров для количественной ПЦР в реальном времени, как правило, также подтверждается секвенированием амплифицированных фрагментов, в «Материалах и методах» и в следующих главах об этом ничего не сказано.

3. Не показана стабильность экспрессии выбранного референсного гена актина. В будущем имеет смысл использовать не менее трех референсных генов.

4. На стр. 38 сказано: «В нетранслируемом контроле флуоресценция не детектирована, что указывает на отсутствие неспецифичной экспрессии». Непонятно, откуда был взят нетранслируемый контроль, как было доказано отсутствие белка, почему в нетранслируемом контроле не должно быть мРНК?

5. Сокращение «ПЦР в реальном времени» написано то РВ-ПЦР, то ПЦР-РВ. В тексте ПЦР написана то русскими буквами, то английскими PCR. В результатах, где использовался метод ПЦР в реальном времени написано RT-PCR. Согласно списку

сокращений это reverse transcription PCR, про которую в материалах и методах ничего не сказано. В списке сокращений много расшифровок только на английском языке.

6. Не описано, как были разработаны праймеры к генам «холодового шока» для ПЦР в реальном времени. При этом в главе 2 есть таблица с этими праймерами (табл. 2.3), а в тексте Главы 3 она нигде не упоминается.

7. Глава 3.5.3 «Анализ экспрессии генов AsCSP1, AsCSP2 и AsCSP3 в вегетативных органах *Allium sativum*» (страница 108) начинается со слов: «К настоящему времени, экспрессия CSP-генов изучена у ограниченного числа видов растений. Так, ранее был проведен анализ экспрессия CSP-генов у пшеницы *T.aestivum* (Karlson et al., 2002), риса *O.sativa* (Chaikam and Karlson, 2008), арабидопсиса *A.thaliana* (Sasaki et al., 2007; Kim et al., 2009), пекинской капусты *B. rapa* subsp. *pekinensis* (Choi et al., 2015), капусты пак-чой *B. rapa* subsp. *chinensis* (Huang et al., 2016) и у некоторых других видов растений. Поэтому, представлялось интересным провести анализ экспрессии идентифицированных трех CSP-генов у...». С моей точки зрения, анализ экспрессии каких-либо генов в каких-либо тканях надо проводить потому, что вы изучаете какое-либо явление и предполагаете или хотите понять возможную роль этих генов в каких-то процессах, а не потому что, экспрессия этих генов «изучена у ограниченного числа видов растений».

В целом можно заключить, что диссертационная работа хорошо оформлена. Основные результаты проведенных исследований проиллюстрированы рисунками и результирующими таблицами. Высказанные в отзыве замечания не носят принципиального характера и не снижают высокой научной значимости полученных результатов.

Содержание автореферата и опубликованных автором оригинальных работ полностью отражают основные положения диссертации. Выводы конкретны, обоснованы приведенными результатами и не вызывают сомнений. В целом, диссертационная работа Филошина Михаила Александровича безусловно является оригинальным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Полученные диссертантом результаты достоверны и соответствуют поставленной цели и задачам.

Таким образом, диссертационная работа Филошина Михаила Александровича на тему: «Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*» по своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г.

№335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Филошин Михаил Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 генетика.

Официальный оппонент

Брускин Сергей Александрович,

заместитель директора по научной работе,
заведующий лабораторией функциональной геномики
Федерального государственного бюджетного
учреждения

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова,

к.б.н., доцент

119991, Москва, ул. Губкина, 3

brouskin@vigg.ru


С.А. Брускин

Подпись Брускина С.А. заверяю,

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова,

д.б.н.


О.А. Огаркова

