

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Бондар Евгении Ивановны «Аннотация генома и предсказание сайтов начала транскрипции для лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.)», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Актуальность темы диссертации определяется необходимостью получения по возможности наиболее полной информации о функционировании молекулярной механики наследственного аппарата лиственницы сибирской и хвойных растений в целом для расширения представлений об эволюции и путях адаптации, для разработки эффективных генетических маркеров и, в конечном счете, для повышения экологической устойчивости и продуктивности таежных лесов. В исследовании Е.И.Бондар был проведен глубокий анализ имеющейся сборки ядерного и цитоплазматических геномов лиственницы. Это позволило автору составить аннотацию генов и повторяющихся элементов, исследовать расположение сайтов начала транскрипции, разработать новые микросателлитные маркеры для ядерного и хлоропластного геномов.

Разработанные в диссертации вопросы имеют большое теоретическое значение, полученные автором результаты являются важным вкладом в молекулярную генетику хвойных растений.

Диссертационная работа изложена на 151 странице и включает введение, три главы, заключение, выводы и обширный список цитируемой литературы (360 наименований). Работа содержит 26 рисунков и 13 таблиц.

Во введении автор обосновывает актуальность темы диссертации, определяет цель и задачи исследования, раскрывает его научную новизну, теоретическую и практическую значимость.

Глава 1 (Обзор литературы) содержит обзор секвенированных и аннотированных геномов, с фокусом на виды голосеменных. Обращается внимание на большой размер геномов, большое число генов и большое содержание повторяющихся элементов у последних. Также автор дает характеристику эколого-биологических особенностей лиственницы сибирской. Хотя автор принимает трактовку вида лиственница сибирская в широком смысле, без деления на восточную расу - *L. sibirica* и западную – *L. sukaczewii*, но на стр. 19 сообщает, что на западе лиственница сибирская граничит с лиственницей Сукачева. Следовало бы придерживаться какой-то одной концепции.

Далее автор останавливается на обзоре подходов к выявлению мобильных элементов, генов, описания промоторных областей генов и на использовании микросателлитных маркеров и их разработке.

В целом глава производит хорошее впечатление, она представляет собой добротный написанный обзор, содержащий много интересной для читателя научной информации.

Глава 2 (Материалы и методы) содержит описание использованных методов аннотации генома и включает описание методов выявления и маскирования повторов и оценки времени вставки ретротранспозонов. Далее описаны идентификация генов с лейцин богатыми повторами и последовательность работ по аннотации генома. Масштаб и сложность последних производит впечатление. В отдельном разделе описаны методы сборки и аннотации цитоплазматических геномов. Вызывает вопрос, почему для сборки хлоропластного генома (раздел 2.2.1) не использовались длинные риды нанопорового секвенирования?

Раздел 2.3 посвящен методам исследования промоторных регионов выявленных генов, раздел 2.4 – методам разработки микросателлитных маркеров. При разработке маркеров автор ориентировалась на возможность реализации методики на основе полиакриламидного электрофореза. Я не согласен с таким подходом, поскольку методика анализа, использующая ПААГ и покраску с помощью этидиумбромидом, крайне трудоемка и сопряжена с риском ошибочной интерпретации. Совершенно ясно, что практическое значение имеет только метод, использующий автоматический секвенатор и амплификацию в мультиплексе. При разработке методики следует ориентироваться только на него. Соответственно необходимо использовать не только мотивы 3-6 нуклеотидов, но и 2 нуклеотидные, а длину ПЦР фрагмента выбрать от 100 нуклеотидов, поскольку короткие фрагменты амплифицируются легче, особенно в мультиплексе. Относительно популяций трех видов *Larix*, использованных для тестирования микросателлитных локусов и оценки уровня изменчивости, популяция Кысыл Сыр располагается к западу от р. Лены, за пределами ареала чистой *L. sajanteri* и должна быть отнесена скорее к *L. gmelinii* или к переходной зоне от *L. gmelinii* к *L. sajanteri* (Абаимов, Коропачинский, 1984).

Глава 3 (Результаты и обсуждение) содержит разделы включающие аннотацию ядерных и цитоплазматических геномов (включая анализ высокоповторяющихся элементов, идентификацию генов с лейцин богатыми повторами, структурную аннотацию), предсказания сайтов начала транскрипции и разработку микросателлитных маркеров.

В результате анализа повторов в сборке генома лиственницы сибирской, основанной на коротких ридах, было выявлено 20,9 млн. высокоповторяющихся элементов, составляющих 40% генома, но при анализе длинных нанопоровых ридов доля повторов достигла 66%, т.е. основная часть генома лиственницы, как и других хвойных состоит из повторяющихся элементов различных классов.

При анализе микросателлитных повторов, помимо насыщенности генома микросателлитными локусами с разной длиной мотива стоило бы представить также распределение числа повторов в локусе.

Важным вопросом является интерпретация времени вставки ретротранспозонов. Автор признает, что после встраивания транспозона в новое место, мутационный процесс начинает его разрушать, и через определенное время распознать его оказывается невозможно. Тут необходимо пояснить, как следует интерпретировать распределение возраста вставки: либо это указывает на волну экспансии транспозонов, либо это просто отражает динамическое равновесие между более-менее постоянным процессом размножения LTRs и процессом их элиминации из генома в результате случайных точковых мутаций и делеций. Первое объяснение кажется маловероятным, учитывая примерно одинаковый возраст инсерций у эволюционно глубоко различающихся таксонов. Также есть вопрос к Рисунку 8. Оценка распределения времени инсерций LTR для *Ginkgo biloba* и *Gnetum gnemon* (4-5 млн. лет) заметно отличаются от соответствующих оценок у Wan et al., (2021) - 10-20 млн. С чем связаны такие отличия?

В результате структурной аннотации генома лиственницы сибирской было выявлено 39000 генных моделей, что заметно меньше, чем у других хвойных имеющих секвенированный геном.

В качестве замечания – Таблица 6 и Таблица 7 частично дублируют друг друга.

Функциональная аннотация позволила аннотировать (определить функции) 78% генных моделей. Большинство из них имели гомологию с генами арабидопсиса.

Значительное внимание было уделено анализу генов, важных для функционирования хвойного растения - биосинтеза фенилаланина, генов программируемой клеточной смерти и генов синтеза гормонов – абсцизовой кислоты, жасмоновой кислоты и этилена.

Отдельный раздел включает аннотацию цитоплазматических геномов.

Митохондриальный геном лиственницы сибирской оказался самым большим на данный момент – 11 млн. нуклеотидов. Благодаря использованию одновременно длинных и коротких ридов получена практически полная сборка митохондриального генома. Были установлены и аннотированы гены и повторяющиеся элементы в хлоропластном и митохондриальном геномах. Было установлено значительное число простых тандемных

повторов в митохондриальном геноме лиственницы сибирской (0.8% генома). Следовало бы воспользоваться такой возможностью для разработки митохондриальных микросателлитных маркеров, которые могут быть весьма полезными для исследования демографических процессов в популяциях лиственницы.

Было проведено исследование распределения сайтов начала транскрипции у нескольких, имеющих сиквенс генома голосеменных видов.

Были разработаны, протестированы и отобраны 14 микросателлитных локусов, высокоизменчивых и универсальных для лиственниц сибирской и даурской, что будет крайне полезно для исследовательских и для практических целей, учитывая неудовлетворительные результаты кросс- амплификации у лиственницы сибирской маркеров, ранее разработанных для лиственниц европейской и Лайеля.

В заключении, я считаю, что представленная диссертационная работа, несмотря на некоторые вопросы, является заметным трудом, обозначившим выдающийся прогресс в исследовании российских лесоводов. Текст диссертации хорошо написан и содержит минимум ошибок. Диссертационная работа Бондар Евгении Ивановны «Аннотация генома и предсказание сайтов начала транскрипции для лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.)" представляет собой завершенное самостоятельное исследование, содержание диссертации полностью соответствует п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 с изменениями, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание степени кандидата биологических наук по, а ее автор Бондар Е.И. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика биологической отрасли науки.

26 февраля 2024 г.

д.б.н. Семериков В.Л.

Заведующий лабораторией
молекулярной экологии растений,

Институт экологии растений и
животных УрО РАН

620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Подпись *Семериков В.Л.*
Заверяю *Семериков В.Л.*
Нач. общего отдела ИЭРиЖ УрО РАН

