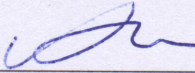


УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, доктор биологических наук,

 А.М. Кудрявцев

«18» марта 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук на диссертационную работу Скапцова Михаила Викторовича «Соматоклональная изменчивость *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. в культуре *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа Скапцова М.В. посвящена сравнительному изучению соматоклональной изменчивости в культуре *in vitro* на различных стадиях культивирования каллусов и регенерантов двух видов растений из различных семейств - *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. Стоит особо отметить, что в своей диссертационной работе автор использовал широкий спектр методов для определения влияния длительной пролиферации клеток на скорость и характер цитогенетического, молекулярно-генетического и эпигенетического полиморфизма.

Культивирование клеток и тканей растений *in vitro* является перспективным методом сохранения генотипов растений с ценными признаками и биоразнообразия в целом и используется в мировой практике для создания банков генплазмы. Большое значение имеет культивирование *in vitro* и для получения отдаленных гибридов и растений, модифицированных методами генной инженерии.

Процессы дедифференцировки и пролиферации каллуса при культивировании клеток и тканей растений *in vitro* сопровождаются явлением соматоклональной изменчивости. Соматоклональная изменчивость генотипа и эпигенотипа может приводить к изменениям на анатомо-морфологическом, физиологическом, биохимическом уровнях устройства растительного организма. Наблюдаемые изменения в зависимости от целей могут, как являться проблемой, в случае необходимости сохранения генотипа и

эпигенотипа объектов культивирования так и, напротив, представлять большой интерес в выделении клонов с улучшенными характеристиками.

Поэтому изучение закономерностей соматклональной изменчивости и механизмов, лежащих в ее основе, на различных объектах и уровнях организации живой материи является весьма актуальным вопросом.

Структура и содержание диссертации, замечания. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 149 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, пяти глав, посвященных описанию полученных результатов и их обсуждению, заключения, выводов и списка литературы, включающего 327 источников.

В главе **Обзор литературы** приведена краткая характеристика видов *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. - их таксономическое положение, распространение, применение и биологические особенности. Отдельный раздел обзора литературы посвящен рассмотрению использованию культуры *in vitro* для сохранения биоразнообразия и генофонда растений. В нем приводятся сведения об истории культивирования клеток и тканей растений, основных процессах, происходящих в культуре *in vitro* и факторах, их определяющих, а также различных задачах, которые возможно решать с использованием данного подхода. Особое внимание уделено роли культур *in vitro* в сохранении генофонда растений. Третий раздел обзора литературы посвящен феномену соматклональной изменчивости, которая индуцируется при культивировании тканей *in vitro* и проявляется у растений-регенерантов. Автор систематизирует данные об известных проявлениях, методах изучения и факторах, индуцирующих соматклональную изменчивость. Также рассмотрены проблемы, связанные с соматклональной изменчивостью при сохранении генофондов растений с использованием культур *in vitro*.

Генетическая трансформация и изменчивость трансгенных конструкций в культуре растений *in vitro*. В последнем разделе обзора литературы приводится информация об основных методах трансформации и репортерных генах, используемых при создании трансгенных растений, а также проблемах стабильности трансгенных конструкций в культуре растений *in vitro*. Подробно рассмотрен метод агробактериальной трансформации, как наиболее широко используемый в настоящий момент.

Глава **Материалы и методы** состоит из двух основных разделов: «Объекты и схема исследований» и «Методы исследований». В разделе Объекты и схема исследований приведены причины, побудившие автора к выбору в качестве объектов исследования видов *Rumex acetosa* и *Inula britannica*. Однако не приведено детального описания отобранного для работы растительного материала, а также не описана схема

исследования. Основную часть раздела занимает таблица с данными о полиморфизме 12 различных видов.

Автор пишет «Ранее нами на основе методов фрагментного анализа были проведены скрининговые исследования по поиску видов с высоким внутрипопуляционным полиморфизмом, возможности длительного культивирования каллуса и подверженности агробактериальной трансформации. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали экстрагированную ДНК из высушенных гербарных образцов исследуемых видов из коллекции гербария Алтайского государственного университета (АЛТВ). В целом было использовано более 150 образцов, 12 видов растений из 25 популяций (Таблица 1).»

В результате остается не ясным с использованием каких именно маркеров было проведено исследование, не приведены объемы выборок для каждой популяции. Также остается не ясным, какой именно материал исследуемых видов был использован далее в работе – сколько и каких образцов, и как они соотносятся с данными таблицы 1?

Стоит отметить, что данные, представленные в настоящем разделе, опубликованы автором и соответствующая статья приведена в перечне работ, опубликованных по теме диссертации. Поэтому логичнее было бы перенести содержащуюся в настоящем разделе информацию в главы 3, или 6. Вместо этого следовало бы в настоящем разделе дать детальное описание использованного на разных этапах работы растительного материала и схему исследования.

Раздел Методы исследования состоит из пяти подразделов. В подразделе Культивирование *in vitro* описан отбор растительного материала для введения в культуру *in vitro*. Автор пишет следующее: «Для введения в культуру *in vitro* использовали экспланты с не менее чем пяти растений *R. acetosa* и пяти растений *I. britannica* по сто эксплантов для каждой линии. Одновременно в культуре поддерживали 4 типа образцов: трансформированная линия *R. acetosa*; нетрансформированная линия *R. acetosa*; трансформированная линия *I. britannica*; нетрансформированная линия *I. britannica*».

Не понятно, откуда были получены растения-доноры эксплантов, как эти растения и полученные линии соотносятся с популяциями, описанными в разделе «Объекты и схема исследований»? Что имеется в данном случае в виду под линией? Значит ли написанное, что все экспланты с пяти и более генетически разнородных растений объединялись в одну линию, и далее в работе все сравнения изменений, происходящих на различных стадиях культивирования проводятся на случайных (причем немногочисленных) выборках и даже единичных растениях из этой генетически разнородной смеси? Если это так, то большинство полученных результатов нельзя считать

достоверными. Необходимо было бы создать отдельные линии для каждого из использованных растений-доноров эксплантов и проводить все сравнения в пределах отдельных линий, а далее уже сопоставлять друг с другом. Также не очень понятно, почему один и тот же растительный материал на разных стадиях культивирования автор называет разными линиями?

Далее приводится схема исследования, которая отсутствовала в разделе «Объекты и схема исследований». Кратко описаны процесс введения в культуру, культивирование и состав среды.

Не ясно, почему в данном разделе приводится также описание методов определения суммы полифенолов, экстракции ДНК, ПЦР анализа, NGS секвенирования и статистической обработки результатов?

В следующем подразделе подробно описаны процедуры агробактериальной трансформации и анализа трансформированных линий. Не очень понятным остается то, что автор подробно описывает создание вектора pBIK201iGs, но пишет, что трансформация проводилась другим вектором - pBIK102iGs.

В подразделе Цитогенетический анализ автор детально описывается анализ относительного содержания ДНК в образцах исследуемых видов на различных стадиях культивирования с использованием метода проточной цитометрии и сравнительный анализ числа хромосом у регенерантов и доноров эксплантов. Стоило бы также указать, для всех ли (пяти и более для каждого вида) растений-доноров эксплантов был выполнен анализ числа хромосом и содержания ДНК, это остается непонятным.

Название следующего подраздела «Фрагментный анализ» не вполне соответствует его содержанию. Фактически в разделе описывается RAF-анализ, а фрагментный анализ в данном случае является только одним из этапов.

В тексте данного подраздела встречается утверждение, что «RAF-анализ эффективно используется для оценки генетического разнообразия и межпопуляционных взаимоотношений как у животных, так и растений», однако ссылок на соответствующие работы, подтверждающие эффективность данного метода, не приведено. При этом метод сложно назвать широко распространенным. Далее в тексте содержится утверждение «Для оценки полиморфизмов в культуре *R. acetosa* L. и *I. britannica* L. использовали олигонуклеотиды серии k02a (5' CATTCGAGCA 3') и k02b (5' GTCTCCGCAG 3'), определенные как оптимальные в результате скрининговых исследований и процесса оптимизации ПЦР» со ссылкой на работу Waldron et al., 2002. Однако не уточняется для каких объектов эти праймеры являются оптимальными. В то же время, известно, что выбор праймеров сильно зависит от объекта исследований.

Подраздел NGS-секвенирование содержит описание получения и секвенирования ДНК-библиотек фрагментов генома *R. acetosa*, полученных с использованием RAF- и MAFLP-подходов, а также анализа транскриптома каллуса *R. acetosa* после 12-ти месяцев культивирования. К сожалению, в данном разделе отсутствует описание таких важных процедур, как сборка и нормализация, не указаны параметры, используемые при сборке и поиске ошибок. Не представляется возможным понять, что точно имеется в виду под “дублированными последовательностями” и, как следствие, оценить целесообразность применения данного этапа в обработке полученных автором данных.

Кроме этого, в разделе не указаны параметры программы BLAST, используемые для поиска. Выбор корректных параметров для поиска имеет большое значение.

Как следует из всего вышеизложенного, стоило бы существенно пересмотреть структуру и содержание подразделов главы МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ, особое внимание при этом уделив детальному описанию растительного материала, использованного на разных этапах работы с указанием объемов выборок.

Глава 3. Введение в культуру *in vitro* содержит детальное описание процесса введения в культуру подбора условий культивирования и культивирования *R. acetosa* и *I. britannica*. Михаилу Викторовичу удалось подобрать условия, обеспечивающие индукцию каллуса у 100% эксплантов и высокий процент органогенеза. Также были установлены оптимальные концентрации ПВП и тиосульфата натрия, обеспечивающие снижение уровня накопления фенольных производных в каллусных тканях и продление срока культивации. В результате также были получены листовые экспланты, каллусы (3, 6 и 12 месяцев культивирования) и регенеранты (полученные из каллусов 3, 12 месяцев культивирования) для дальнейших исследований.

Глава 4 посвящена сравнительному анализу экспрессии гена β -глюкуронидазы в трансгенных линиях каллуса и полученных из них регенерантов у видов *R. acetosa* и *I. britannica*. В результате проведенного анализа были получены данные об элиминации трансгена при сроке пролиферации каллуса *R. acetosa* более шести месяцев. Выдвинуто предположение, что подобное явление обусловлено мутациями и вариациями эпигенетического контроля на фоне проявления соматоклональной изменчивости. Вместе с тем, уровень экспрессии репортерного гена в культуре *I. britannica* и его присутствие на различных стадиях культивирования оставались на постоянном уровне.

Глава 5. Цитогенетическая изменчивость в культуре *in vitro*. В результате исследования относительного содержания ДНК и числа хромосом при культивировании растительного материала *R. acetosa in vitro* М.В. Скапцовым были продемонстрированы возникновение полиплоидии, анеуплоидии, эндополиплоидии и изменения размера

генома. Было показано, что для регенерантов *R. acetosa* были характерны полиплоидия и значительные изменения в относительном содержании ДНК, тогда как для регенерантов *I. britannica* была отмечена утрата хромосом и соответствующее снижение относительного содержания ДНК. При этом фенотипических изменений на стадии регенерации для *R. acetosa* и *I. britannica* отмечено не было. Полученные результаты показывают необходимость тщательного контроля генетической изменчивости с использованием молекулярно-генетических и цитогенетических методов, выбора типов культуры, видов эксплантов, состава питательных сред и анализа ответа различных генотипов на стресс при сохранении биоразнообразия в генетических коллекциях в условиях *in vitro*.

В главе 6 рассматриваются результаты анализа генетической изменчивости в культуре *in vitro* на основе RAF-маркеров. При анализе генетической изменчивости *R. acetosa* было показано, что полиморфизм растений-доноров эксплантов составил 75,7 %. Полиморфизм в каллусной линии трех месяцев пролиферации увеличивался до 89,72 %. В отсутствие регуляторов роста, при индукции геммогенеза, наблюдалось снижение полиморфизма каллусных линий (%P, P4 = 70,9 ± 3,28). Тогда как после регенерации, наблюдалось восстановление полиморфизма (%P, P5 = 78,5 ± 3,28). Данные результаты получены при исследовании 60 образцов. Как пишет автор работы «Были исследованы линии каллусов, трех (P2), шести (P3), 12-ти месяцев (P4) культивирования, регенеранты из каллуса 12 месяцев культивирования (P5) и контрольные линии (P1) по 12 образцов из каждой.»

Ранее в разделе Методы исследования была приведена информация, что для введения в культуру *in vitro* использовали экспланты с не менее чем пяти растений *R. acetosa*. Как в этом случае можно удостовериться в том, что выявленные различия в уровне полиморфизма у образцов, полученных на разных стадиях культивирования, обусловлены изменениями, вызванными соматической изменчивостью, а не тем, что для анализа разных стадий были отобраны образцы, полученные от разных растений-доноров эксплантов и от разного их числа?

Далее автор пишет «Генетические дистанции Нея между линиями возрастали пропорционально длительности культивирования и достигали максимального значения между контрольными линиями (P1) и линиями регенерантов (P5) (рисунок 19 а, б).» Однако из рисунка 19 б видно, что максимальное значение дистанции наблюдается между линиями P1 и P4, а не P5, как пишет автор.

Также является непонятным следующее – исследования были проведены на 60 образцах, а на рисунке представлено всего 5. Что это за образцы? Случайно отобранные образцы по одному для каждого типа, или же проводилось какое-либо усреднение? Если

да, то каким образом? Ни в тексте раздела, ни в соответствующем разделе методики объяснений не приведено. Учитывая имеющиеся вопросы к использованному для анализа материалу, нагляднее было бы привести дендрограмму для всех 60 использованных образцов.

То, что выявленные различия могут быть скорее объяснены ошибкой в планировании исследования и нерепрезентативностью выборок подтверждается также представленными в разделе результатами AMOVA-анализа, которые показали, что 93 % объясняются изменчивостью внутри линий (как автор называет образцы, отобранные на одной стадии культивирования), и только 7 % – между линиями, а также результатами анализа в STRUCTURE, приведенными на рисунке 20.

Далее в разделе приводятся результаты анализа Генетической изменчивости *I. britannica*. Исследование проводилось аналогичным образом и к нему возникают аналогичные вопросы.

В главе 7 представлены результаты анализа генетической изменчивости *R. acetosa* на основе данных NGS-секвенирования. В первом разделе представлены результаты анализа ДНК-фрагментов, полученных методом RAF. Название подраздела «NGS-секвенирование случайных фрагментов ДНК» следовало бы сделать более точным. Также не хватает точности и при описании самих результатов. Остается непонятным, сколько образцов и каких линий были секвенированы. Не ясно, что именно представлено на рисунках 22 и 23. Это консенсусные последовательности для полученных кластеров или исходные прочтения? При описании результатов анализа автор несколько раз пишет про случайные мутации и SNP: «В данном случае для контрольной линии (P1) выявлено 48 случайных замен в 11 вариантах ДНК последовательностей, среди которых 9 охарактеризованы как однонуклеотидные полиморфизмы (SNP)» и «Нами было показано в результате секвенирования фрагментов RAF, что данные маркеры с высокой долей специфичности для подобных ДНК маркеров разделяют случайные мутации и SNP». Не понятно, что автор вкладывает в понятие случайных замен и как они отличаются от SNP?

В тексте встречается следующее утверждение: «Данный вывод позволяет утверждать и о частичном сохранении данных мутаций у растений-регенерантов, так как генетические дистанции, рассчитанные на основе фрагментного анализа, максимальны между растениями донорами эксплантов и регенерантами.» Но в то же время, как уже было отмечено из рисунка 19(б) следует, что генетические дистанции являются максимальными между растениями донорами эксплантов (P1) и линией P4, а не линией P5, как утверждает автор. Кроме того, не совсем ясно почему это же утверждение нельзя сделать напрямую, основываясь на данных NGS секвенирования?

Во втором разделе главы 7 представлены результаты анализа ДНК-фрагментов, полученных методом MAFLP-анализа. Также как в первом разделе после прочтения остается непонятным, сколько образцов и каких линий были секвенированы. Результаты представлены недостаточно полно, поэтому возникает много вопросов к автору. Так, автор пишет «Закономерности в функциональных генах представлены не так значительно и в большинстве случаев слабо коррелируют между стадиями культивирования (таблица 10).» Совершенно непонятно о каких закономерностях идет речь, требуется уточнение. В таблице 10 представлены результаты аннотации полученных последовательностей. Стоит отметить, что без указания характеристик найденных хитов, как минимум E-value и процента идентичности, оценка достоверности представленной в таблице аннотации не представляется возможной.

Далее автор пишет «На стадии длительного культивирования каллуса P4, наблюдаемые ранее метилированные ретроэлементы не обнаружены, кроме гомологичной последовательности к gtt1-7714-re-5 элемента *Glycine tomentella* Hayata, относящегося к семейству Gypsy.» Поскольку автор не указывает сколько и каких линий было секвенировано и с каким покрытием, отсутствие ретроэлементов может являться артефактом, вызванным недостаточной глубиной прочтения анализируемых образцов. Далее написано следующее: «Максимальные различия по данным полногеномного выравнивания установлены между образцами со стадии P1 и P2, с показателем идентичности (Identical Sites) 25,527 сайтов на уровне 84,7 % при общем покрытии (Ref-Seq Coverage) 21,5 %. Образцы со стадий P3-P4 имели показатели идентичности в районе 87 % (таблица 11). Тогда как максимальная идентичность наблюдалась между стадиями P1 и P5. На основе полученных результатов возможно предположить об изменении общего метилирования после введения в культуру и пролиферации каллуса и некотором восстановлении данного показателя на стадии регенерации, что отчасти соответствует данным об изменении метилирования ретротранспозонов.» Однако данные результаты противоречат кладограмме, представленной на рисунке 26. Наиболее простым объяснением данного факта является некорректность выравнивания последовательностей, полученного с помощью одной из программ. Требуется дополнительная верификация выравниваний, без которой заключение автора «о значительных изменениях в метилировании именно после 6 месяцев культивирования каллуса, тогда как на ранних этапах характер метилирования остается схожим с контрольными образцами эксплантов» кажется необоснованным.

Кроме того для разделов 7.1 и 7.2 открытым остается вопрос о том, чем обусловлены выявляемые различия между разными стадиями культивирования -

изменениями, вызванными соматклональной изменчивостью, или тем, что для анализа разных стадий были отобраны образцы, полученные от разных растений-доноров эксплантов и от разного их числа?

В подразделе 7.3 представлены результаты сравнительного анализа данных NGS-секвенирование библиотеки кДНК каллуса *R. acetosa* 12-ти месяцев культивирования, полученной диссертантом и данных секвенирования кДНК листьев *R. acetosa*, депонированных в базе данных NCBI. В результате анализа было выявлено меньшее разнообразие транскриптов при секвенировании библиотеки, полученной из каллуса. Основываясь на этом автор пишет следующее: «Еще одним доказательством эпигенетической изменчивости является вариации в экспрессии групп генов, выявленных нами в результате анализа транскриптома и GO аннотации. Пул 110 мРНК менее разнообразен в каллусных линиях, что, видимо, связано со снижением специализации и дедифференцировкой клеток.»

Данное заключения недостаточно обосновано, т.к. сделано на основании анализа всего лишь одной библиотеки без использования повторностей. Кроме того, при секвенировании библиотеки, полученной из каллусной линии было получено всего около 25 миллионов оснований, в то время как для сравнения использовалась библиотека для которой была получена глубина чтения почти в 20 раз больше (415 миллионов оснований). Поэтому вполне вероятным объяснением выявленных различий может быть различие в глубине секвенирования сравниваемых библиотек, а не различий в экспрессии, как заключает автор.

При прочтении диссертационной работы становится очевидно, что автор провел очень большую и трудоемкую работу, овладел широким спектром методов и получил важные результаты. Михаил Викторович ввел в культуру два ресурсных вида растений - *R. acetosa* и *I. britannica*. Михаилу Викторовичу удалось подобрать условия, обеспечивающие индукцию каллуса у 100% эксплантов и высокий процент органогенеза, а также позволяющие увеличить срок культивации за счет снижения уровня накопления фенольных производных в каллусных тканях. Очень интересные результаты были получены диссертантом при анализе соматклональной изменчивости методами цитогенетики. Однако небрежное описание растительного материала и методов, использованных на разных этапах работы, несколько снижают общее положительное впечатление от диссертации.

Научная новизна основных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. В диссертационной работе М.В. Скапцова впервые проведена оценка соматклональной изменчивости при длительном культивировании видов *R. acetosa* и *I. britannica in vitro*. Проведена оценка соматклональной вариабельности изученных видов в культуре *in vitro*. Выявлена изменчивость метилирования ДНК и пула транскрибируемых генов *R. acetosa*. Показано постепенное элиминирование рекомбинантного репортерного гена *gusA*. Разработаны олигонуклеотиды для амплификации гена *gusA* и проведения метил чувствительного AFLP-анализа. В результате отбора в культуре *in vitro* впервые получены полиплоидные растения *R. acetosa* с нереккомбинируемыми половыми хромосомами, ранее не известные в природе и культуре.

Научная и практическая ценность полученных результатов. Полученные в рамках работы результаты представляют не только научный, но и практический интерес. Так, автором работы разработаны протоколы размножения и поддержания видов *R. acetosa* и *I. britannica* в культуре *in vitro*, а также протоколы генетической трансформации данных видов. Разработаны рекомендации, протоколы и буферы для оценки степени соматклональной изменчивости методами ПЦР анализа и проточной цитометрии.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат отражает содержание диссертации.

Подтверждения основных результатов диссертации в научной печати. Результаты работы были представлены автором на профильных конференциях и опубликованы в виде 12 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и трех патентов на изобретение.

Заключение. В целом, несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа Скапцова М.В. является законченным научным исследованием и отличается новизной и актуальностью. Работа выполнена на высоком экспериментально-методическом уровне и представляет как научную, так и практическую ценность.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что представленная диссертационная работа Скапцова Михаила Викторовича «Соматклональная изменчивость *Rumex acetosa* L. и *Inula britannica* L. в культуре *in vitro*» полностью соответствуют 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 Скапцов М.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре Отдела генетики растений и Отдела генетических основ биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), 15 марта 2019 года, протокол № 1.

Хадеева Наталия Васильевна, khadeeva@vigg.ru

Ведущий научный сотрудник

Лаборатории генетики растений ИОГен РАН,

кандидат биологических наук

03.00.07 (03.02.03) – «Микробиология»

Доцент по специальности «Генетика»

Подпись Хадеевой Н.В. удостоверяю:

ученый секретарь ИОГен РАН,

доктор биологических наук, профессор

Абилев Серикбай Каримович



Хадеева Н.В.



Абилев С.К.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН).

119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3.

(499) 135-62-13, (499) 132-89-62

iogen@vigg.ru