

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу *Сканцова Михаила Викторовича* «Сомаклональная 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. Индуцируемая культивированием *in vitro* сомаклональная изменчивость позволяет существенно повысить генетическое разнообразие исходного растительного материала, что позволяет отбирать клоны с улучшенными характеристиками для селекционной работы. Вместе с тем, возникающие неконтролируемые мутации нежелательны при генно-инженерных манипуляциях или при клональном размножении с целью сохранения генотипов редких растений или растений с ценными признаками. Характер сомаклональной изменчивости зачастую видоспецифичен и проявляется по-разному на разных стадиях развития клонированного растения. Изучение биоразнообразия этого явления необходимо для разработки подходов к ее детекции и содержанию растительных клонов, а также актуально с точки зрения понимания общих закономерностей сомаклональной изменчивости.

Новизна исследования и полученных результатов. Автор впервые разработал протоколы культивирования *in vitro* Щавеля кислого *Rumex acetosa* L. (сем-во Гречишные) и Девясила британского *Inula britannica* L. (сем-во Астровые) и использовал эти два вида в качестве модельных для оценки сомаклональной изменчивости в ходе их длительного культивирования. Для этих видов впервые проанализированы изменения кариотипов и геномов, для *R. acetosa* охарактеризованы изменения метилирования ДНК и экспрессии функциональных генов. Впервые получены полиплоидные растения *R. acetosa* с половыми хромосомами, не вступающими в рекомбинацию.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертант использует традиционные научные методы обоснования полученных результатов и выводов. Им изучены и проанализированы опубликованные результаты и теоретические положения других авторов по теме исследования.

Обоснованность результатов, выдвинутых диссертантом, основывается на согласованности поставленной цели работы, определяемых ею задач, выносимых на защиту научных положений, полученных материалов и сделанных научных выводов.

Личный вклад автора несомненен. Он самостоятельно осуществил лабораторные исследования, включая введение в культуру и культивирование образцов *R. acetosa* и *I. britannica*, анализ генетической изменчивости соматклонов и их цитогенетический анализ, оформил и проанализировал полученные результаты и написал диссертацию.

Достоверность научных положений, выводов, рекомендаций. Высокая степень достоверности результатов исследования определяется достаточным объемом материала, применением экспериментальных методов, апробированных мировым научным сообществом, адекватных методов статистической обработки.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты раскрывают характер соматклональной изменчивости у двух видов цветковых растений. Этому явлению дана разносторонняя характеристика, включающая оценку на хромосомном и геномном уровнях. Разработанные автором модификации питательных сред, протоколы размножения и поддержания Щавеля кислого и Девясила британского в культуре *in vitro*, а также их генетической трансформации, могут быть использованы генетиками растений и агробиотехнологами. Несомненно, окажутся востребованными и составленные автором рекомендации, протоколы и буферы для оценки соматклональной изменчивости методом ПЦР и проточной цитометрии, а также разработанные олигонуклеотиды для амплификации гена *gusA* и проведения метил чувствительного AFLP-анализа. Материалы диссертационной работы могут и должны быть использованы в преподавании вузовских ботанических, генетических и агробиотехнологических дисциплин.

Структура и объем работы. Диссертация М.В. Скапцова изложена на 149 стр. текста и представляет собой рукопись, включающую традиционные разделы, озаглавленные «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Заключение», «Выводы», «Список литературы». Главы диссертационной работы «Введение в культуру *in vitro*», «Экспрессия β -глюкуронидазы в культуре *in vitro*», «Цитогенетическая изменчивость в культуре *in vitro*», «Генетическая изменчивость в культуре *in vitro*» и «Генетическая изменчивость *R. acetosa* на основе данных NGS-секвенирования» логично построены, отличаются последовательностью и, по сути, представляют собой «Результаты и обсуждение». Иллюстративный материал представлен 29 рисунками и 11 таблицами. Список литературы обширен и включает 327 источников.

Оценка содержания диссертационной работы. Название диссертации отражает ее содержание. Автореферат соответствует диссертации.

Во «Введении» излагаются общие вопросы: актуальность исследования, цель и задачи исследования, научная новизна, практическая ценность, выносимые на защиту положения, апробация работы, структура и объем диссертации, приводится число публикаций.

Глава «Обзор литературы» начинается с довольно подробного ботанического описания изучаемых видов. Далее приводится общая информация по культивированию *in vitro* клеток и тканей растений, обсуждается влияние компонентов питательных сред на клеточную дедифференцировку и дифференцировку. В третьей подглаве приводится анализ литературы по соматклональной изменчивости, исследованиям динамики изменений геномов культивируемых клеток. Понятно и логично представлен обзор методов анализа соматклональных вариантов. Подглава «Генетическая трансформация и изменчивость трансгенных конструкций в культуре растений *in vitro*» выглядит немного оторванной от основной траектории изложения. По мнению рецензента глава 1.4 изобилует излишними методическими подробностями получения трансформированных растений, за этим теряется информация по выявляемой изменчивости полученных трансформантов.

Глава «Материалы и методы исследований» представляет объекты и схему исследования, включает подробное описание методов. Она позволяет оценить личный вклад автора в исследование проблемы соматклональной изменчивости. Дано описание протоколов введения в культуру *in vitro* мезофильных эксплантов *R. acetosa* и *I. britannica* и последующего их культивирования, агробактериальной трансформации эксплантов, включая описание использованных векторных конструкций, методов гистохимического анализа экспрессии гена *gusA*, приводится описание проведения ПЦР в различных вариантах. Цитогенетический анализ соматклонов был проведен с помощью проточной цитометрии и методом анализа давленных препаратов. Оценка генетических различий каллусных линий и линий регенерантов *in vitro* была проведена методом случайно амплифицированных ДНК-фрагментов (RAF, randomly amplified DNA fingerprinting). Приводится описание использованных в работе методов полногеномного секвенирования фрагментов RAF-анализа, метилированных последовательностей ДНК *R. acetosa* и транскриптома каллуса стадии 12 месяцев культивирования. В этой же главе приводятся пояснения к выбранным методам статистической обработки.

В главах 3-7 приведены результаты работы с сопутствующим обсуждением. В главе 3 содержится описание результатов экспериментов по модификации питательных сред для максимальных темпов роста каллусов

щавеля и девясила, для снижения накопления производных полифенолов при культивировании каллусной ткани *R. acetosa*. В главе 4 приведена оценка уровня экспрессии гена *gusA* в трансформированных линиях *R. acetosa* и *I. Britannica*. Показано, что при длительном культивировании репортерный ген элиминируется в линиях *R. acetosa*, для линий *I. britannica* с низким уровнем соматоклональной изменчивости различий в экспрессии и изменений в копийности *gusA* автором выявлено не было. В главе 5 приводятся результаты цитогенетического анализа соматоклонов изучаемых видов; автором выявлены полиплоидизация, гаплоидизация, потери отдельных хромосом. Результаты анализа генетической изменчивости на основе RAF-анализа приведены в главе 6. Приведены значения индекса Шеннона, используемого в качестве меры разнообразия внутри исследуемых групп (каллусных линий и регенерантов). Глава 7 посвящена результатам полногеномного секвенирования образцов соматоклонов *R. acetosa*, что позволило оценить уровень деметилирования/метилирования некоторых транспозонов на стадиях пролиферации каллуса и регенерации. К сожалению, стандартные подходы к анализу данных полногеномного секвенирования включают этап удаления повторов, в т.ч. тандемных, хотя по всей видимости, именно эта часть генома является наиболее пластичной.

В заключении автор подытоживает сказанное о выявленной соматоклональной изменчивости при длительном поддержании пролиферации клеток каллусов двух видов исследованных растений.

Выводы, предложенные автором, согласуются с поставленными задачами и логично вытекают из полученных данных. Список литературы составлен предельно аккуратно.

В качестве замечаний отмечу следующее:

1. *Замечания по содержанию и оформлению.* Смысловая опечатка присутствует на с. 20 при описании белка KNOTTED 1 – он назван «белком гомеодомена», тогда как гомеодомен - структурный домен белков, связывающих ДНК или РНК.

Концентрация праймеров для ПЦР указана неверно. Указана 0,5 пМ (с. 52, 53, 56) (вместо обычно используемой 0,2-0,5 мкМ). Неверное значение связано с ошибкой в обозначении молярной концентрации – по всей видимости, подразумевалось 0,5 пмоль/мкл.

Рисунки 2 и 3 приведены на английском языке, рисунок 4 слишком «перегружен» информацией при полном отсутствии пояснений в подписи к нему.

Рис. 6 – нет расшифровки приведенных структурных элементов.

Рис. 11 и 14 – отсутствует подпись, какой маркер был использован. Было бы удобнее обозначить дорожки не номерами, а над дорожками подписывать происхождение образцов.

На с. 84 указана ссылка на рис. 18 г, хотя имеется в виду рис. 18 д – нормальный кариотип *I. britannica*.

2. *Нарушения правил цитирования.* Рецензентом обнаружена всего одна неточность при цитировании литературных источников: с. 7 строка 2 (ошибочно приведены инициалы авторов).

3. *Стилевые погрешности.* Употребление слова «полиморфизм» во множественном числе (с. 8, 22, 29, 59, 83, 88, 110, 112) не кажется правильным. Синонимы, которые можно было бы употребить, – полиморфные локусы, вариации. Крайне неудачна и формулировка «изменчивость генетического полиморфизма», к сожалению, присутствующая и в выводах (с. 114).

«Нерекомбинируемыми хромосомами» (с. 9) – лучшим вариантом было бы «нерекомбинирующими хромосомами» или «хромосомами, не вступающими в рекомбинацию».

Употребление слова «генотип» не всегда верно. В некоторых случаях было бы правильно употребить слово «геном», чтобы избежать таких фраз, как «изменения в генотипе не затрагивают работу генов, отвечающих за формирование фенотипа растения» (с. 24), «активность мутационных процессов на уровне генома и генотипа» (с. 59).

В общем в удовлетворительном изложении информации иногда встречаются недоработанные фразы без подлежащего и сказуемого (см. например, с. 41, 2 абзац) и неуклюжие фразы: «Хромосомы, а также другие ядерные компоненты такие, как вариации содержания РНК и ДНК» (с. 30), «соматоклональная изменчивость при микроразмножении генотипов» (с. 33), «подтверждение генетической идентичности с исходным материалом размера генома» (с. 33), «генетически измененной ДНК» (с. 40).

С. 77, подпись к рис. 15, русский перевод слова «бар» – «масштабная линейка».

Термины «культивация» (с. 54) и «сокультивация» (с. 55) – правильное было бы заменить на «культивирование».

Не понятно, что имел в виду автор на с. 76 в неудачно сформулированном предложении «...высказывается гипотеза, что мутации могут возникать в связи с посттранскрипционным контролем экспрессии генов, особенно с множеством копий в геноме».

Аббревиатура «Мбп» (с. 79) – является транслитерацией английского сокращения, русский вариант – млн.п.н. (миллион пар нуклеотидов).

С. 99, заголовок таблицы – неверное использование слова «гомологичность» - должно быть «уровни гомологии».

Выявлено некоторое число опечаток, в том числе «менделеЕвская сегрегация трансгена» (с. 38) – должно быть «менделевская».

Заключение

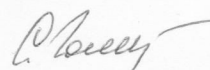
В целом, отмеченные недочеты имеют редакционный характер и не снижают значимость диссертационной работы для науки и практики.

Диссертационная работа Скапцова Михаила Викторовича представляет собой законченное исследование, основанное на привлечении достаточного фактического материала, собранного с высокой долей личного участия.

Считаю, что диссертационная работа полностью отвечает требованиям, установленным п. 9 Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10 2018 г.) «О порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Скапцов Михаил Викторович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Официальный оппонент:

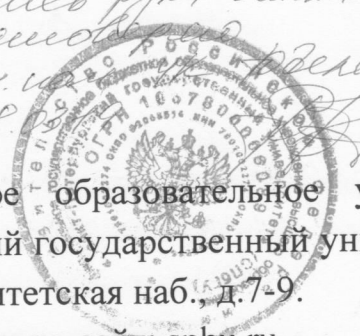
Доцент кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», кандидат биологических наук (03.03.04 – гистология, цитология, клеточная биология)



Светлана Анатольевна Галкина

18.03.2019

*Подпись ректора СПбГУ
Удостоверенная
Сам. подп. Галкина СВ
18.03.2019*



Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д.7-9.
Тел: +7 (812) 328-20-00, эл.почта: spbu@spbu.ru, сайт: spbu.ru