

ОТЗЫВ

официального оппонента

о диссертации Скапцова Михаила Викторовича

«СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ *RUMEX ACETOSA* L. И *INNULA BRITANNICA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*»

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность. Работа, выполненная Михаилом Викторовичем Скапцовым, является вполне актуальной. Без биотехнологии уже нельзя прокормить возрастающее население Земли и лечить его, а биотехнология невозможна без культуры тканей *in vitro*, которая имеет не только разнообразное практическое применение, но и используется в науке как модель – новая, экспериментально созданная, биологическая система, претерпевающая процессы изменения в ходе своего развития. Изучение этих изменений у двух новых объектов, способы их выявления, динамики, возможных причин и механизмов их появления составляют содержание диссертации.

Новизна. Ресурсные виды *Rumex acetosa* и *Innula britannica* пока не выращиваются в культуре *in vitro*, хотя по многим их полезным свойствам это было бы целесообразно, и проведенная диссертантом работа по подбору условий их длительного культивирования, определению возможности трансформации, и, главное, выявлению разнообразных проявлений соматоклональной изменчивости при длительном культивировании обоих видов, несомненно дает много новых ценных сведений для науки.

Цель и задачи исследований. Сформулировано в целом адекватно, за исключением того, что не упомянуто, что для оценки экспрессии β-глюкуронидазы планируется получить и изучить трансформированные линии. Кроме того, как и во всем тексте, наблюдается некоторое пренебрежение к точности терминологии. Так, третий пункт – «изучить полиморфизм кариотипов, цитотипов и генотипов на различных стадиях культивирования *R. acetosa* и *I. britannica*.» Что здесь понимается под цитотипом – неясно, этот термин встречается единожды в диссертации, без объяснения, и ни разу – в автореферате. Последовательность использованных подходов составлена логично, жаль только что эта последовательность не всегда выдержана в структуре диссертации, что несколько затрудняет чтение. Так, раздел,

касающийся генетической трансформации, в литературном обзоре – последний, в методах – в середине, а при описании результатов выявления соматклональной изменчивости – практически первый.

Диссертация изложена на 149 страницах (35 страниц – список литературы). Диссертация состоит из Введения, 7 глав, заключения, 6 выводов, списка литературы (327 ссылок, 297 – на иностранных языках), включает 11 таблиц и 29 рисунков.

Глава 1. Обзор литературы занимает 33 страницы. Работы, составляющие содержание диссертации, касаются большого круга очень сложных многоплановых явлений, активно изучаемых в мире, представления по многим вопросам в них быстро меняются. Михаил Викторович попытался изложить эти явления широко, но сделать это в коротком объеме задача объективно трудная, с которой автор справился не вполне.

Раздел 1 описывает объекты и содержит много ботанической информации, но не содержит важной генетической. Диссертант переписал длинные описания обоих видов из Флоры СССР, хотя в дальнейшем не касается морфологических признаков видов, и перечислил выделявшиеся подвиды и разновидности (которые тоже можно было бы опустить, ибо они в дальнейшем не привлекаются). Между тем, даже хромосомные числа не приведены. Не упомянуто, что у *I. britannica* находили цитотипы разной ploидности $2n= 16, 24$ и 32 . Неизвестно, проверялись ли эти виды на предмет миксоploидии, которая была найдена у некоторых видов, обнаруживавших увеличение ploидности при культивировании *in vitro*.

Раздел 2 - Культура *in vitro* для сохранения биоразнообразия и генофонда растений. Автор частично излагает историю развития данного подхода и описывает детали отдельных процессов, выясненные в последние годы. Изложены общие сведения и приведены данные, полученные при культивировании самых разных видов. Жаль, что не упомянуты уже предпринимавшиеся попытки выращивания *in vitro* объектов диссертации – довольно давние – *Rumex acetosa* (Srivastava et al., 1969, Ćulafić et al., 1987) и недавняя *Innula britannica* (Danova et al., 2013).

Раздел 3, посвященный изменчивости в культуре тканей *in vitro*, начинается с ошибки в первой фразе «...проявляющаяся у растений-регенерантов изменчивость получила название «соматклональной изменчивости», а измененные растения были названы соматклонами». Это неверно, соматклонами Larkin и Scowcroft (1981) предложили называть все растения-регенеранты, полученные от любой клеточной культуры, независимо, измененные они или нет. В разделе описывается много возможных проявлений соматклональной изменчивости у разных видов на разном уровне. Примечательно, что среди работ, приводимых как примеры

оценки соматклональной изменчивости, немало таких, где эта изменчивость не была найдена или оказалась небольшой. Жаль, что мало внимания уделено соматклональной изменчивости у главного модельного вида растений – *Arabidopsis thaliana*, у которого она изучалась с разных сторон, разными методами и это дало много ценных сведений.

В разделе 4, как сказано в автореферате, «обсуждаются основы генетической инженерии». Но эти основы невозможно изложить кратко, да это и не нужно в контексте работы, достаточно было описать использование экспрессии репортерных генов как фенотипического признака соматклональных изменений. При этом в разделе уделено внимание вещам, не имеющим непосредственного отношения к содержанию диссертации – трансформации с помощью вирусов, методам биобаллистики, репортерным белкам, не использовавшимся в данной работе. Однако не обсуждены некоторые важные аспекты, например, элиминация трансгена, изучавшаяся на многих объектах и выявленная в диссертации у *Rumex acetosa*, в разделе даже не упомянута.

Глава 2 описывает Материал и методы.

Сообщается, что при исследовании генетического полиморфизма разных видов было использовано более 150 образцов, 12 видов растений из 25 популяций. Непонятно, сколько растений каждой популяции было исследовано, нет ли зависимости числа полиморфных локусов от количества образцов. В таблице 1 указано, что у *R. acetosa* и у *I. britannica* определялся полиморфизм растений из двух популяций. Но далее не сообщается, какой же материал был взят для дальнейшей работы – из одной популяции (какой?) или из обеих? Чтобы проследить изменения, происходящие при культивировании *in vitro*, надо точно знать, что за материал был взят, чтобы при необходимости изучить его дополнительно

Методы описаны на мой взгляд по большей части хорошо, с указанием важных деталей, некоторые детали добавлены в соответствующих главах. Но есть и вопросы, в частности, по определению полиморфизма методом RAF. Как указано в диссертации, этот метод позволяет выявлять очень малые количества амплифицированного фрагмента. Однако авторы метода в статье (Waldron et al., 2002), на которую ссылается диссертант, подчеркивают, что такую возможность дает использование ими радиоактивной или флюоресцентной метки, чем метод и отличается от RAPD и DAF. Но в описании метода в диссертации ни о какой метке не говорится, и это отличие не отмечено и не объяснено, как и то, что использовано всего два праймера – достаточно ли этого для оценки полиморфизма? Кроме того, по-видимому, в диссертации (и в автореферате) какая-то опечатка в описании праймеров, так как праймеры

K02a и k02b (Waldron et al., 2002), отличаются лишь последним нуклеотидом, и последовательность праймера K02a не соответствует описанной Михаилом Викторовичем.

Есть вопросы и по цитогенетическим методам, которых я коснусь при обсуждении главы 5. Детали, касающиеся культивирования *in vitro*, более детально описаны (включая подбор и оптимизацию сред) в Главе 3. Мезофильные экспланты маленькие, что увеличивает вероятность получения безвирусных растений.

Глава 3. «Введение в культуру *in vitro*» описывает как осуществлялся подбор концентрации ряда компонентов среды с контролем содержания полифенолов, оказывающих отрицательное влияние на активность роста и длительность существования в культуре.

Глава 4. «Экспрессия β-глюкуронидазы в культуре *in vitro*». Трансген введен как репортерный белок и показано, что у щавеля он на некоторой стадии элиминируется, а у девясила нет. Автор считает что соматоклональные изменения, найденные им в трансформированных регенерантах щавеля, вызваны только культивированием *in vitro*, а не процессом трансформации (стр. 75), не приводя аргументов в пользу такого допущения. В обзоре литературы были приведены ссылки, авторы которых придерживались такого же мнения. Однако можно заметить, что были и свидетельства иного рода – в работах с арабидопсисом, с томатом было найдено, что процент образовавшихся полиплоидных регенерантов был неодинаков при разных способах трансформации.

Глава 5. Цитогенетическая изменчивость. Здесь интереснее данные по щавелю, так как у девясила выявлено меньше изменчивости. Но к тому, как получены и представлены данные у меня есть вопросы. При описании методов в автореферате указано, что в качестве стандарта использовали *Pisum sativum* L. сорт 'Глориоза'; для *R. acetosa* в Главе 2 диссертации (стр. 57) – что использовали вид *Vicia faba* сорт 'Inoves', а в главе 5 – что *R. acetosa* L. в контроле (т.е. экспланты). Непонятно, какой же стандарт использовался. Или в каких случаях какой. Если брали в качестве стандарта экспланты, исследовали ли их на предмет миксоплоидии? На рис. 16, озаглавленном «Анализ относительного содержания ДНК регенерантов» где представлены гистограммы, на трех вариантах (б-г) есть пики эксплантов, а на первом (а), где представлена, как указано «норма» - экспланта не указано, то есть стандарта нет? При этом есть два пика, 2С и 4С. На рис. 17, где представлены гистограммы образцов, демонстрирующих эндополиплоидию, вообще нет стандартов. Как автор судил о наличии гаплоидов? Кроме того, непонятно, почему автор называет содержание ДНК, выраженное в

пикограммах, относительным. И если бы на гистограммах на осях, как обычно, было указано число ядер и уровень флуоресценции, это было бы нагляднее.

Хотя заявлялось, что для анализов бралось по 20 образцов каждой стадии каллусной культуры и регенерантов, и подсчет хромосом производили у каждого варианта по 20 метафазным пластинкам, никаких статистических данных по числам хромосом в каллусах и регенерантах разного возраста не представлено. Из каких цифр получают показатели эндополиплоидии, которые приводит автор, и у какой доли образцов она наблюдалась, неизвестно. В таблице 7, где указано, в какой доле образцов преобладали разные хромосомные числа, образцы не разделены по возрастам. При такой форме представления результатов, остается много неясного. Результаты исследования девясила описаны еще более кратко.

И окончательные выводы (2-ой и частично 1-ый и в Выводах), по этому разделу при вроде бы большой проделанной работе, сформулированы весьма неопределенно – констатируется «специфичность уровня», полиплоидизация, эндополиплоидизация и гаплоидизация без какой-либо конкретизации.

Глава 6. «Генетическая изменчивость в культуре *in vitro* на основе RAF-маркеров».

Показано, что полиморфизм у щавеля и у девясила возрастает на первых порах культивирования, когда в среде много ростовых веществ. Удаление регуляторов роста из состава питательной среды вызывает снижение полиморфизма у обоих видов. Вызывает сожаление что не указан размер фрагментов, нет фотографий гелей, приведены только результаты статистической обработки четырьмя методами.

Глава 7. «Генетическая изменчивость *R. acetosa* на основе данных NGS-секвенирования».

Исследование производилось только на щавеле, у которого изменчивость, судя по ранее полученным результатам, более выражена. Осуществлялось на основе ранее уже исследовавшихся RAF-маркеров, секвенированных методом NGS. Получили 42 кластера, подробно исследовали один с высоким уровнем полиморфизма, определив для набора последовательностей каждой линии число однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и случайных замен и сравнив линии. Из описания мне не вполне понятно, почему более протяженные (или какие?) замены (=мутации) автор называет случайными. И как получается число их, мне непонятно. Когда я попробовала посчитать на рисунке 23 отдельно мутации, затрагивающие более одной позиции, снипы и все варибельные позиции, числа по большей части не совпали с указанными автором. Например, в варианте P5 не 33 (13+20), а всего 23 варибельных позиции.

В этой главе также описаны результаты, полученные метилчувствительной модификацией метода полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (MAFLP). При этом использованы сравнительно новые метилзависимые эндонуклеазы отечественного изобретения и производства и самостоятельно разработанные автором диссертации олигонуклеотиды, содержащие специфичные последовательности к сайтам рестрикции используемых эндонуклеаз. Амплифицированные фрагменты были секвенированы с помощью NGS секвенирования, и поиском среди последовательностей ГенБанка (NCBI) была произведена геномная локализация метилированных участков. Оказалось, что значительная часть последовательностей гомологична сателлитной ДНК и ДНК ретротранспозонов различного класса, у которых выявлена изменчивость в метилировании в процессе культивирования *in vitro*.

NGS было применено также для анализа транскриптома *R. acetosa*, подготовлена библиотека кДНК каллуса 12 месяцев культивирования, осуществлена сборка *de novo* и проведены функциональная аннотация и сравнение с библиотекой к ДНК щавеля, имеющейся в ГенБанке. Пул m-RНК и разнообразие подкатегорий у каллусной культуры были сниженными по сравнению с контролем, что может быть результатом эпигенетической изменчивости.

Заключение написано на мой взгляд хорошо. Что же касается выводов, они подтверждены данными, кроме третьего, где идёт речь о случайных мутациях. Но могли быть лучше сформулированы, так как с одной стороны есть некоторое дублирование, с другой – некоторые важные моменты, присутствующие в заключении, не отражены в выводах. Еще есть мелкие замечания. Автор видового названия должен приводиться лишь при первом упоминании вида. Встретилась ссылка, отсутствующая в списке литературы (Бу Дык Куанг, Шамина 1983) и ссылка, не соответствующая тому, о чем она должна свидетельствовать. На стр. 105 говорится: «Большинство метилированных остатков цитозина сконцентрировано в сателлитных повторах, транспозонах и эндогенных вирусах (Guseinov, Vanyushin, 1975).» В этой замечательной работе, исследовавшей 5-метилцитозин в растениях хлопчатника, зараженных грибом, нет ничего ни о сателлитной ДНК, ни о вирусах, ни о транспозонах – само это слово лишь годом ранее было предложено для ДНК прокариот, *E. coli*, где нашли, что устойчивость к антибиотику переместилась из одной плазмиды в другую.

В тексте, к сожалению, много опечаток, и в диссертации и в автореферате (в последнем в том числе под рисунком 5 – подпись к другому рисунку). Встречаются грамматические ошибки (особенно часто – отсутствие согласования в падежах, роде, числе), много неудачно сформулированных предложений, как в смысловом, так и в стилистическом отношении, на это автору надо обратить самое серьезное внимание. В соседних предложениях встречаются

гиберелловая кислота и гиберрелиновая, цитофлюориметрические исследования и метод проточной цитометрии. Вероятность не апостериорная, как дважды на стр. 87, а апостериорная, variation в применении к внутривидовым таксонам по-русски переводится как разновидность, а не вариация. Слово контиг почему-то склоняется в женском роде – 7803 контиги, хотя в русском языке принят мужской род – контиг, контигов. Термин коллинеарный (применительно к пакету программ выравнивания Mauve), примененный авторами цитируемой статьи, зачем-то заменен на синтетный, что несколько искажает смысл, а что означает в данном контексте «синтения» в кавычках – не объяснено. Терминология – очень важная сторона научного текста, и неряшливость здесь недопустима. Для генетики с её сложной терминологией это особенно важно.

Однако главное - экспериментальные данные, их в работе получено много, и по большей части они представляются достоверными. Я вижу основной смысл и ценность работы в поиске и применении новых подходов для изучения стадий развития растений в культуре *in vitro* и в попытках использовать самые современные. Арсенал примененных методик широк и разнообразен и говорит о высокой квалификации автора как экспериментатора. Надо отметить творческий подход, выразившийся в предложениях модификаций методов, в том числе трех предложений, официально запатентованных. Стремление овладеть разными методами и даже смелость на этом пути весьма похвальны, но необходимо сознавать, что в наше время почти ничего не осталось простого, и каждый метод, каждая проблема требует изучения очень большого материала и осознания сложной и противоречивой информации.

Ценен опыт по введению в культуру двух новых видов. Соответствующие соматоклоны могут быть использованы как для науки, так и для практики, особенно *Rumex acetosa*. Этот вид, представляющий пищевую и лекарственную ценность, как было недавно показано, может эффективно осуществлять биогенез наночастиц железа и серебра, что повышает целесообразность его культивирования *in vitro*, основы которого заложены в рецензируемой работе.

Учитывая актуальность, новизну и объем полученных данных, теоретическую и практическую значимость, диссертационная работа, несмотря на сделанные мною весьма многочисленные и разнообразные замечания, заслуживает положительной оценки. Основное содержание диссертации достаточно полно отражено в нескольких опубликованных работах, по результатам получено три патента, материал доложен на российских и международных конференциях, автореферат соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, представленная к защите кандидатская диссертация М.В.Скапцова «Соматоклональная изменчивость *Rumex acetosa* L. и *Innula britannica* L. в культуре *in vitro*» 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, а её автор, М.В. Скапцов заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв представил

Шнеер Виктория Семеновна

доктор биологических наук

ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Ботанического института им. В.Л.Комарова Российской академии наук

Адрес: Санкт-Петербург, 197376 ул. Профессора Попова д.2

Телефон: (812) 372-54-33

e-mail: shneyer@rambler.ru

дата 19.03.2019

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ

ОТДЕЛ КАДРОВ

Ботанического института
им. В.Л. Комарова

Российской академии наук

