

Отзыв

На диссертационную работу Хафизовой Галины Васильевны
«ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ Т-ДНК
У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *NICOTIANA* L.»

По специальности 03.02.07 Генетика.

Актуальность темы исследования

С развитием геномики изменилось представление об эволюционных процессах и роли в них такого явления как горизонтальный перенос генов. Для прокариот горизонтальный перенос генов - типичный механизм проявления комбинативной изменчивости. Так, анализ геномов 22 археобактерий и 159 эубактерий показал, что порядка 80% генов в каждом геноме участвовали в процессе горизонтального обмена на том или ином этапе эволюции прокариот (Dagan et al., 2008). Открывается все больше фактов роли горизонтального переноса генов в эволюции не только прокариот, но и эукариот. Ярким примером является передача гена *ToxA*, контролирующего некроз индуцирующий токсин, от гриба *Parastagonospora nodorum* возбудителю желтой пятнистости пшеницы грибному патогену *Pyrenophora tritici-repentis* (Friesen et al., 2006). Также были найдены фрагменты генома паразитической бактерии вольбахии в геномах насекомых и круглых червей-филярий, а у вида *Drosophila ananassae* геном бактерии оказался вставлен в геном хозяина целиком (Hotopp et al., 2007). По последним данным, группа стрептофитов, включающая наземные растения и харофитовые водоросли приобрела в процессе эволюции 593 семейства генов от бактерий, грибов и животных (Jianchao Ma, et al., 2022).

Известно, что агробактерии способны передавать и встраивать в геном растительной клетки фрагмент своей плазмиды Т-ДНК, а в составе генома растения – клТ-ДНК. Обычно в природе агроинфекция не приводит к закреплению Т-ДНК и ее передаче половому потомству, однако было показано, что в геномах некоторых видов растений родов *Nicotiana* и *Linaria*, не подвергавшихся агроинфекции, содержатся последовательности, гомологичные Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes*. Было показано, что актов трансформации в эволюции рода *Nicotiana* было несколько. В настоящее время клТ-ДНК найдена у 16 представителей рода *Nicotiana*. Для трех видов *Nicotiana*, для которых есть полногеномные данные, проведен детальный анализ клТ-ДНК, включающий информацию по количеству копий в геноме, составу клТ-ДНК и активности

входящих в нее генов. Именно прочтение новых геномов внесет вклад в понимание действительной роли горизонтального переноса генов в эволюции эукариот, в том числе представителей рода *Nicotiana*, а изучение их клТ-ДНК поможет прояснить возможную роль Т-ДНК в растениях, выяснить происхождение отдельных генов, а также понять общие закономерности совместной эволюции агробактерий и табака. Таким образом актуальность работы не вызывает сомнений.

Целью данной работы являлось изучение структурно-функциональной организации клеточной Т-ДНК у представителей рода *Nicotiana*.

В задачи диссертанта входила сборка геномов *Nicotiana glauca* и *N. noctiflora* и анализ структуры клТ-ДНК этих видов, а также анализ экспрессии генов в клТ-ДНК *N. noctiflora* и изучение внутривидового полиморфизма клТ-ДНК *Nicotiana* на примере сортов *N. tabacum*.

В диссертации Хафизовой Г.В. представлены результаты, обладающие научной новизной и имеющие практическую значимость.

Впервые получены полногеномные данные для видов *N. glauca* и *N. noctiflora*. Геном *N. noctiflora* собран до уровня контигов, в результате поиска последовательностей агробактериального происхождения в геноме найдены две различные по составу клТ-ДНК, NnТ-ДНК1, и NnТ-ДНК2, свидетельствующие о множественных актах трансформации данного вида.

В составе клТ-ДНК *N. noctiflora* выявлены интактные гены - измерены их относительные уровни экспрессии в различных органах растения. Показан высокий уровень экспрессии в корнях, что согласуется с данными по другим природно-трансгенным видам.

Впервые проанализированы последовательности клТ-ДНК растений *N. tabacum* у восьми сортов культурного табака.

Краткая характеристика основного содержания диссертации.

Структура диссертации.

Диссертация Хафизовой Г.В. состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения.

Список литературы включает 140 источников, в том числе 137 на иностранном языке.

Диссертационная работа изложена на 112 страницах, содержит 4 таблицы, иллюстрирована 25 рисунками.

В разделе «Введение» отмечена актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, разъяснены научная новизна и практическая значимость. Цель работы соответствует поставленным задачам.

«Обзор литературы» состоит из 5 глав и занимает 35 страниц машинописного текста. Обзор написан интересно, хорошим литературным языком. В обзоре автором уделено особое внимание ботаническому описанию, эволюции и филогении рода *Nicotiana*. Также подробно описывается современное состояние исследований клТ-ДНК в связи с эволюцией этого рода.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены все молекулярно-генетические, а также биотехнологические методы и методы биоинформатики, использованные в работе.

Основные результаты описаны в главе «Результаты и обсуждение». Глава состоит из двух разделов и основные фундаментальные результаты работы по анализу структуры клТ-ДНК представителей подрода *Petunioides*, включающие результаты сборки геномов *N. glauca* и *N. noctiflora*, а также анализ структуры клТ-ДНК этих видов и анализ экспрессии генов в клТ-ДНК *N. noctiflora* отображены в первом разделе. Автором получены значимые результаты, имеющие несомненную научную и практическую ценность, которые не противоречат полученным ранее в работах других авторов. Первым растением, в геноме которого была обнаружена клТ-ДНК было именно табачное дерево - *Nicotiana glauca* и разными авторами ранее были получены данные по структуре клТ-ДНК этого вида, однако полногеномные данные до настоящей работы отсутствовали, и именно данные полногеномного секвенирования *N. glauca*, полученные автором, позволили уточнить природу клТ-ДНК этого вида и сравнить с ранее полученными результатами других авторов. В результате проведенной работы новых клТ-ДНК в геноме *N. glauca* не было обнаружено, что позволило автору сделать значимый вывод об однократной агробактериальной трансформации вида *N. glauca*. Далее была выполнена задача по проведению полногеномного секвенирования и сборку генома другого родственного вида табака *N. noctiflora* для последующего поиска и анализа клТ-ДНК в его составе. Надо отметить, что имеющиеся данные по наличию клТ-ДНК данного вида были достаточно противоречивы, и только после успешной сборки автором генома *N. noctiflora* в его составе были выявлены две клТ-ДНК, различающихся по составу и организованные в виде несовершенных инвертированных повторов. Причем автором были сделаны значимые выводы о нескольких актах трансформации в ходе эволюции вида *N. noctiflora*. Также на основании полученных

данных был сделан важный вывод о том, что виды *N. noctiflora* и *N. glauca* были трансформированы независимо, а не получили клТ-ДНК от предковой формы.

Важные результаты были получены по анализу экспрессии генов в клТ-ДНК *N. noctiflora*. Был подтвержден сам факт экспрессии гомологов бактериальных генов и показано, что гены клТ-ДНК *N. noctiflora* активнее всего экспрессируются в корнях, что согласовалось с данными по другим видам природно-трансгенных растений.

Надо отметить, что автором получены, несомненно, значимые фундаментальные результаты. Виды *N. glauca* и *N. noctiflora* являются первыми представителями подрода *Petunioides* с секвенированными геномами, что значительно расширяет возможности для проведения филогенетических исследований рода *Nicotiana*. Собранный геном *N. glauca* был загружен в базу NCBI Genome WGS, что делает его открытым для других исследователей и является несомненно важным как фундаментальным так и практическим результатом данной работы.

Вторая часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена изучению внутривидового полиморфизма клТ-ДНК *Nicotiana* с использованием сортов *N. tabacum*. Был показан низкий уровень генетического полиморфизма у сортов культурного табака, что, на мой взгляд, связано с самим селекционным процессом.

Полученные в работе, полногеномные данные *N. glauca* и *N. noctiflora* могут быть использованы в различных фундаментальных и прикладных исследованиях: для изучения генетического контроля вторичных метаболитов, что важно для фарминдустрии и биотехнологии и для понимания возможной функции клТ-ДНК для растений.

Важным практическим результатом работы является разработка молекулярного маркера на основе делеции в центральной части клТ-ДНК (ТА), разработанного для *N. tabacum*, который может быть использован для изучения филогении культурного табака, а также в качестве одного из маркеров для паспортизации сортов. Однако вывод автора о возможности использования данного маркера для разделения сортов на группы, считаю несколько преждевременным, так как малая выборка сортов табака, использованная в работе (8 сортов) не позволяет делать такие заключения. Для этого данный маркер надо верифицировать на большом количестве сортов.

Достоверность полученных результатов определяется использованием проверенных современных методик исследований, широкой апробацией результатов эксперимента на

российских и международных научно-практических конференциях, публикацией научных статей в центральных журналах, освещающих с достаточной полнотой содержание диссертации.

Замечания и вопросы

1. В обзоре литературы не хватило ботанического описания видов *N. glauca* и *N. noctiflora*. Такое подробное описание дается только для *N. tabacum*. Также было бы полезно добавить главу по основным агробактериальным генам, гомологи которых входят в состав кл Т-ДНК и постоянно упоминаются в работе.
2. В работе геном *N. glauca* был депонирован в базу данных, был ли депонирован геном *N. noctiflora* в базу данных NCBI Genome WGS и если нет, то планируется ли?
3. В работе был проведен анализ экспрессии генов кл Т-ДНК *N. noctiflora* была ли исследована экспрессия у *N. glauca*?
4. Существует несколько гипотез, описывающих возможные варианты попадания кл Т-ДНК в геном растения, в том числе и гипотеза о множественных актах трансформации представителей рода *Nicotiana*. Совместная эволюция агробактерии и растения – непрерывный процесс. Возможно ли отличить кл Т-ДНК, полученную растением в результате горизонтального переноса генов в настоящее время или в недавнем прошлом от полученной на ранних этапах эволюции видов рода *Nicotiana*?
5. Автор связал низкий уровень полиморфизма проанализированных сортов табака по ДНК последовательностям как растительных генов так и кл Т-ДНК как с недавним происхождением сортов, так и с прохождением видом *N. tabacum* “бутылочного горлышка” в ходе своей эволюции. Можно ли интерпретировать данные, полученные на 8 сортах культурного табака на эволюцию вида в целом? Планируется ли продолжение работы на расширенной выборке сортов *N. tabacum*, включающей образцы дикого табака?

Общее заключение. Основные результаты диссертации опубликованы в 3 научных статьях в изданиях, рекомендованных ВАК и 13 научных работ в других изданиях. Работа прошла широкую апробацию на различных научных российских и международных конференциях.

В целом следует отметить, что в работе приведен большой фактический материал, изученный на современном уровне с использованием передовых молекулярно генетических методов. Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, соответствуют поставленным задачам, автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Еще раз хочу подчеркнуть, что данное исследование является интересной, объемной фундаментальной работой и все высказанные замечания ничуть не умаляют ее высокой научной и практической значимости.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертация Хафизовой Галины Васильевны является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов, а ее содержание полностью соответствует всем требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (ред. от 01. 10. 2018).

Таким образом, Хафизова Галина Васильевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник лаборатории иммунитета растений к болезням
«Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений»

кандидат биологических наук

по специальностям 06.01.11 - Защита растений, 03.00.15 – Генетика

Баранова Ольга Александровна

18 августа 2022 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

196608 Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д.3, тел.470-43-84, info@vizr.spb.ru

Подпись руки *Барановой О.А.*

Удостоверяю

Секретарь
директора



М.М. Косыгина