

ОТЗЫВ

на диссертацию Михайловой Александры Сергеевны на тему: «Структурно-функциональная организация регуляторных генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40 биосинтеза фенольных пигментов у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика.

Диссертационное исследование Михайловой А.М. посвящено выявлению и исследованию структурно-функциональной организации генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, контролирующих биосинтез фенольных пигментов и отвечающих за изменчивость по окраске волокна у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L.

Актуальность работы. Диссертационная работа Михайловой А.С. посвящена актуальной проблеме современной генетики растений – изучению структурно-функциональной организации регуляторных генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, контролирующих биосинтез фенольных пигментов у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. Тема находится на стыке молекулярной генетики, биоинформатики и селекции растений, что определяет ее высокую теоретическую и практическую значимость.

Хлопчатник является важнейшей сельскохозяйственной культурой, однако традиционная селекция долгое время была ориентирована на получение белого волокна, удобного для последующего окрашивания. В связи с тем, что использование отбеливателей и искусственных красителей снижает качество текстиля, возникла необходимость создания сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном, поскольку это является востребованным и экологически безопасным. Несмотря на то, что структурные гены биосинтеза флавоноидов у хлопчатника идентифицированы достаточно полно, регуляторные гены семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, входящие в состав комплекса MBW, остаются охарактеризованными лишь фрагментарно. В частности, остается неясной полная картина эволюции паралогичных и гомеологичных копий этих генов в геноме аллотетраплоидного хлопчатника, а также их вклад в формирование различий по окраске волокна. Таким образом, тема диссертационного исследования, направленного на идентификацию и характеристику регуляторных генов, контролирующих изменчивость по окраске волокна, является, безусловно, актуальной и своевременной.

Научная новизна и основные результаты. В ходе работы автором впервые проведен детальный структурно-функциональный анализ генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* у *G. hirsutum* с различной окраской волокна. Впервые охарактеризованы особенности эволюции гомеологичных и паралогичных копий этих генов у четырёх видов хлопчатника (*G. arboreum*, *G. raimondii*, *G. barbadense*, *G. hirsutum*). По результатам оценки времени дивергенции методом «молекулярных часов» показано, что паралогичные дупликации

исследованных генов произошли до дивергенции диплоидных видов от общего предка рода *Gossypium*, а гены *WD40* находятся под более строгим очищающим отбором ($Ka/Ks = 0,104$) по сравнению с *R2R3-MYB* ($Ka/Ks = 0,413$) и *bHLH-MYC* ($Ka/Ks = 0,674$).

Важным результатом работы стало выявление гена-кандидата *GhMYB10-A*. У четырех светло-бурых образцов в первом экзоне этого гена обнаружены две миссенс-замены (Лиз26Тре и Тре37Арг) в консервативном R2-домене, которые не выявлены у остальных исследованных образцов; у трех из этих образцов найдена также вставка в промоторной области. Молекулярное моделирование и докинг (Phyre2, Missense3D, 3DLigandSite, HEX 8.0.0) позволили автору предположить, что данные замены могут влиять на структуру R2-домена и способность белка связываться с ДНК, что указывает на его регуляторную функцию. Полученные результаты создают хорошую основу для дальнейшей проверки роли *GhMYB10-A* на более широкой выборке и с использованием функциональных подходов.

Автором впервые оценен относительный уровень транскрипции ключевых структурных (*GhDFR*, *GhANR*, *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB1R1*, *GhMYB10-A*) генов на поздних стадиях развития волокна (31–41 день после опыления (ДПО)) у образцов с контрастной окраской. У бурых образцов в ряде временных точек отмечена повышенная экспрессия *GhMYB10-A*, *GhDFR* и *GhANR* (флавоноидный путь), у зеленого образца к 39–41 ДПО – *Gh4CL* и *GhMYB1R1* (фенилпропаноидный путь), что согласуется с современными представлениями о биосинтезе соответствующих пигментов. У буро-зеленого образца к 35 ДПО одновременно повышены уровни обоих регуляторных генов и *Gh4CL*; автор рассматривает это как возможное отражение совместной активации двух путей (в заключении диссертации в этом перечне назван также *GhANR*).

Структура диссертации. Работа изложена на 161 странице текста. Диссертация состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, изложения материалов и методов исследования, результатов исследования, их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа иллюстрирована 32 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 286 источников, из них 6 отечественных и 280 зарубежных.

Во «Введении» автором кратко обоснованы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна и значимость работы, положения, выносимые на защиту.

В главе «Обзор литературы» автор описывает эволюцию и систематику рода *Gossypium*, биосинтез флавоноидов, регуляцию экспрессии генов транскрипционными факторами, в том числе комплексом MBW, а также особенности генетического контроля бурой и зеленой окраски хлопкового волокна.

Глава «Материалы и методы» содержит описание объекта исследования — 11 образцов *G. hirsutum* из коллекции ВИР, контрастных по окраске волокна и гипокотыля, условия

выращивания растений и фиксации коробочек хлопчатника, схемы биоинформатического анализа (CottonFGD, CottonGen, GenBank, MEGA-X, SWISS-MODEL, Phyre2, HEX и др.), в ней также представлено описание типовых методов молекулярной генетики (выделение ДНК и РНК, ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, количественная ОТ-ПЦР) и подходов к статистической обработке данных.

Основную часть работы составляют главы «Результаты» и «Обсуждение результатов». На первом этапе исследований Михайловой А.С. были выявлены дублицированные копии регуляторных генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40, участвующих в контроле биосинтеза флавоноидных пигментов, в геномах всех использованных для анализа секвенированных диплоидных и аллотетраплоидных видов хлопчатника, а также проведен *in silico* анализ их структурной организации. Филогенетический анализ последовательностей генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40 позволил проанализировать эволюционные особенности формирования дублицированных копий генов этих семейств. Автором была проведена оценка относительного уровня транскрипции ключевых структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов в природноокрашенном волокне на разных сроках после опыления. Более подробно была дана характеристика GhMYB10-A как компонента MBW-комплекса и его участия в регуляции биосинтеза флавоноидов и пигментации волокна хлопчатника.

В главе Заключение результаты обобщены, а пять выводов соответствуют поставленным задачам.

Основные результаты опубликованы в пяти публикациях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых в Scopus (одна принята в печать), и представлены на 10 конференциях.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе был впервые проведен полномасштабный структурный анализ дублицированных копий регуляторных генов семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40 (комплекс MBW), участвующих в контроле биосинтеза флавоноидных пигментов, у хлопчатника. К достоинствам работы следует отнести уточнение представлений об эволюции регуляторных генов комплекса MBW у хлопчатника и о механизмах формирования окраски волокна. Практическая значимость работы состоит в выявлении аллельных различий *GhMYB10-A*, которые могут стать основой для разработки ДНК-маркеров для отбора форм с природноокрашенным волокном, и в депонировании секвенированных последовательностей в GenBank.

Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Достоверность и обоснованность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Экспериментальные данные

получены автором с использованием современных и адекватных поставленным задачам методических подходов. Научные положения и выводы опираются на данные, полученные с использованием широкого набора современных методов: биоинформатического анализа (BLAST, MEGA-X, филогенетический анализ, предсказание 3D-структур), секвенирования по Сэнгеру и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Статистическая обработка включала параметрические и непараметрические критерии (t-тест, ANOVA с post-hoc тестом Тьюки, U-тест Манна-Уитни, тест Краскела-Уоллиса, тест Данна с поправкой Холма).

К достоинствам работы относится корректная методическая реализация эксперимента по оценке экспрессии: три биологические и две технические повторности на каждую временную точку, три референсных гена, подобранных алгоритмом geNorm, эффективность амплификации 95–105 %, контроль специфичности по кривым плавления.

В процессе прочтения диссертации у рецензента возникло несколько замечаний к работе.

1. Ограниченность выборки. Исследование проведено на 11 образцах *G. hirsutum* (12 линий в таблице 1: образец к-7544 представлен двумя линиями с разной окраской гипокотыля), для 8 линий выполнено полное секвенирование промоторной и кодирующей областей, для 4 образцов (к-8161, к-7314, к-7843, к-467) — только фрагменты первого и второго экзонов *GhMYB10-A*. Выявленные аллельные варианты *GhMYB10-A* требуют проверки на более широкой выборке для оценки их репрезентативности для всего разнообразия вида.

2. Отсутствие функциональной валидации. Роль *GhMYB10-A* в формировании окраски предсказана методами *in silico* (моделирование, докинг, предсказание белок-белковых взаимодействий), но не подтверждена экспериментально (трансформация, РНК-интерференция, CRISPR-нокаут, дрожжевая двугибридная система для взаимодействия с bHLH-MYC/WD40). Автор указывает на необходимость экспериментальной валидации для установления функциональной дифференциации выявленных генов (с.67-68), что свидетельствует о критичном отношении к полученным результатам.

3. Анализ связи окраски гипокотыля с аллельными различиями и тканеспецифичность регуляции. В работе проведен анализ полиморфизмов генов *GhTT2*, *GhTT8* и *GhMYB10-A* у образцов с различной окраской гипокотыля (зеленая/красная), однако связь не выявлена. При этом красный гипокотыль имеют лишь две линии (к-7544 и к-8129), поэтому отсутствие связи нельзя считать надёжно установленным. Этот отрицательный результат обсуждается лишь в общем виде и следовало бы его обсудить более явно, поскольку он может указывать на тканеспецифичность регуляции.

4. Автор делает заключение о повышенном уровне экспрессии *GhANR* у буро-зеленого образца (заключение, вывод 5), однако по рисунку 30 он не отличается от контрольного.

Кроме того, у рецензента возникли следующие вопросы:

Вопрос 1. Какие критерии использовались для отбора образцов хлопчатника из коллекции ВИР, и насколько полно они охватывают генетическое разнообразие вида *G. hirsutum* по признаку окраски волокна?

Вопрос 2. Планируется ли разработка ДНК-маркеров на основе выявленных аллельных различий *GhMYB10-A*, и если да, то какие типы маркеров (CAPS, KASP) представляются наиболее эффективными?

Вопрос 3. Учитывая, что у буро-зеленого образца наблюдалась одновременная активация флавоноидного и фенилпропаноидного путей, существуют ли, по Вашим данным, общие регуляторные ключевые этапы, координирующие эти пути?

Однако данные вопросы носят дискуссионный характер и не отражаются на общей высокой положительной оценке диссертационной работы.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Михайловой Александры Сергеевны на тему: «Структурно-функциональная организация регуляторных генов из семейств R2R3-MYB, bHLH-MYC и WD40 биосинтеза фенольных пигментов у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L.» соответствует специальности 1.5.7. Генетика.

Диссертация представляет собой завершенное научное исследование, выполненное на хорошем методическом уровне. Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярно-генетических механизмов формирования окраски волокна хлопчатника и создают основу для разработки диагностических ДНК-маркеров для селекции сортов с природноокрашенным волокном. Следует отметить большой объем и трудоемкость проделанной работы. Результаты изложены в печатных работах диссертанта, опубликованных в российских и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Автореферат и опубликованные работы соответствуют содержанию диссертации. Материалы диссертационной работы неоднократно докладывались на научных конференциях.

Диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года, № 748 от 02.06.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1168 от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Работа соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Михайлова Александра Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Отзыв подготовлен заведующей Лабораторией сигнальной регуляции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», доктором биологических наук по специальностям: 1.5.11. Микробиология, 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

д.б.н. Долгих Елена Анатольевна



196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского 3,

Тел.: 8-812-476-24-96

E-mail: ea.dolgikh@arriam.ru

Подпись Долгих Елены Анатольевны, главного научного сотрудника, заведующей лабораторией сигнальной регуляции Федерального государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», доктора биологических наук, заверяю:

Начальник отдела кадров
12.10.2026



М.А. Ковалевская