

Отзыв

официального оппонента Дмитриева Алексея Александровича
на диссертацию Михайловой Александры Сергеевны «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
специальности 1.5.7. – Генетика

Актуальность темы. Хлопчатник – важнейшая сельскохозяйственная культура стратегического назначения. В настоящее время подавляющую часть перерабатываемого сырья составляет волокно белого цвета. Однако использование отбеливателей и искусственных красителей при производстве текстильных материалов повышает стоимость изделий и оказывает негативное влияние на экологию и здоровье человека. В связи с этим является актуальной область селекции, направленная на создание сортов хлопчатника с природноокрашенным волокном. Натуральную окраску хлопкового волокна бурых оттенков в природе обеспечивают фенольные соединения – проантоцианидины. Производные кофейной кислоты, экстрагированные из суберинового слоя, окрашивают волокно в оттенки зеленого цвета. Биосинтез фенольных пигментов регулируют транскрипционные факторы семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, которые в полной мере у хлопчатника не охарактеризованы. В связи с этим в диссертационной работе Михайловой А.С. проводится комплексный биоинформатический и генетический анализ генов, участвующих в биосинтезе фенольных пигментов (проантоцианидинов) и отвечающих за изменчивость по окраске волокна у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L., на выборке коллекции ВИР. Для выбранных генов-кандидатов из семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* определены аллельные варианты у образцов с различной окраской волокна. Методом количественной ПЦР охарактеризованы профили экспрессии наиболее значимых с практической точки зрения ключевых структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов флавоноидного и фенилпропаноидного путей в волокнах хлопчатника различной окраски.

Научная новизна исследования. В представленной работе впервые выполнено комплексное исследование структурно-функциональной организации генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* в геноме аллотетраплоидного хлопчатника *G. hirsutum*. Выявлены особенности эволюции идентифицированных полноразмерных последовательностей гомеологичных и паралогичных копий регуляторных генов биосинтеза проантоцианидинов у четырех видов хлопчатника, включая диплоидные и аллотетраплоидные виды *G. arboreum*, *G. raimondii*, *G. barbadense* и *G. hirsutum*.

Диссертантом впервые проведен сравнительный анализ уровня мРНК генов *GhANR*, *GhDFR*, *Gh4CL*, *GhMYB1R1* и *GhMYB10-A*, играющих ключевую роль в биосинтезе фенольных соединений на поздних этапах развития волокна у образцов хлопчатника с различной окраской волокна. Установлено, что временной интервал с 31 по 41 день после опыления характеризуется не только завершением основной фазы биосинтеза целлюлозы, но и повышенным уровнем мРНК генов флавоноидного и фенилпропаноидного путей.

Впервые полученные данные об экспрессии ключевых регуляторных генов флавоноидного и фенилпропаноидного метаболических путей у образца с буро-зеленой окраской волокна могут указывать на совместное накопление пигментов, обуславливающих данную окраску.

Таким образом, полученные результаты вносят значительный вклад в расширение фундаментальных представлений о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе формирования окраски у волокон хлопчатника.

Теоретическая и практическая значимость работы. Диссертантом впервые идентифицирован ген-кандидат *GhMYB10-A*, ассоциированный с вариабельностью окраски волокна хлопчатника. Полученные при секвенировании различных по окраске и происхождению образцов хлопчатника последовательности генов семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* депонированы в открытую базу данных нуклеотидных последовательностей. Методами молекулярного моделирования предсказано влияние двух выявленных миссенс-мутаций белка GhMYB10-A (Lys26Thr и Trp37Arg) на его свойства. Определено потенциальное снижение ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора GhMYB10-A у образцов со светло-бурой окраской волокна вследствие дестабилизации структурного мотива «спираль-петля-спираль» в домене R2.

In silico анализ подтвердил роль транскрипционного фактора GhMYB10-A как позитивного регулятора поздних этапов флавоноидного пути как одного из компонентов MBW-комплекса, что углубляет фундаментальные представления о молекулярных механизмах накопления пигментов в волокне.

Практическая значимость работы заключается в возможности использования выявленного аллельного разнообразия исследованных генов для разработки ДНК-тест-систем. Это необходимо для развития маркер-ориентированной селекции хлопчатника, в частности создания сортов с заданным цветом волокна.

Научные положения и выводы логичны и обоснованы, подкрепляются полученными результатами.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает список условных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы из 286 источников и 25 приложений. Работа изложена на 161 странице, содержит 1 таблицу, 32 рисунка и выполнена в соответствии с требованиями, предъявляемыми ВАК к кандидатским диссертациям. Диссертация написана хорошим научным языком, ее содержание выстроено четко и логично.

В первой главе диссертант приводит подробный анализ научной литературы, который включает сведения об эволюции и классификации некоторых представителей рода *Gossypium*, рассматривает структуру и роль флавоноидных соединений, а также описывает их общий фенилпропаноидный путь биосинтеза. Отдельный раздел посвящен роли транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов у растений, в частности регуляции биосинтеза флавоноидных соединений комплексом MBW. Далее диссертант описывает этапы развития волокна хлопчатника и процессы накопления пигментов, переходя к физико-химическому анализу пигментов, обуславливающих бурую и зеленую окраску волокна, а также приводит данные об описанных генах-кандидатах, ассоциированных с окраской волокна.

Обобщая литературные данные, диссертант отмечает, что семейства транскрипционных факторов *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, регулирующих биосинтез фенольных соединений, у хлопчатника, в полной мере не охарактеризованы. Оценка транскрипционной активности ключевых структурных и регуляторных генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в биосинтез флавоноидных и фенилпропаноидных пигментов, на стадии визуального проявления пигментации у образцов хлопчатника необходима для дополнения представлений о механизмах накопления пигментов в волокне хлопчатника.

Во второй главе диссертантом описан материал исследования (различные по окраске волокна и происхождению образцы хлопчатника из коллекции ВИР) и использованные методические подходы.

Третья глава посвящена описанию результатов комплексного *in silico* анализа выявленных регуляторных генов из семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40*, включая их структурную организацию, филогенетический анализ, анализ промоторных последовательностей и предсказание 3D-структур белков, кодируемых данными генами. Установлено аллельное разнообразие генов из семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC* у образцов хлопчатника с различной окраской волокна (темно-бурая, светло-бурая и белая) и обнаружен ген *GhMYB10-A*, для которого показана взаимосвязь окраски волокна с выявленным полиморфизмом. Проводится анализ взаимодействия *GhMYB10-A* с другими компонентами регуляторного MBW-комплекса и оценивается потенциальная вовлеченность *GhMYB10-A* в составе комплекса в процессе регуляции биосинтеза флавоноидов и пигментации волокна хлопчатника. Отдельный раздел посвящен оценке уровня мРНК ключевых структурных и регуляторных генов биосинтеза пигментов в природноокрашенном волокне.

В четвертой главе обсуждаются основные результаты диссертационной работы. Филогенетический анализ показал, что паралогичные копии исследованных генов разошлись до дивергенции диплоидных видов от общего предка рода *Gossypium*. Согласно результатам секвенирования полноразмерных регуляторных генов семейств *R2R3-MYB* и *bHLH-MYC*, только для гена *GhMYB10-A* обнаружена взаимосвязь окраски волокна с выявленным полиморфизмом. Впервые обнаруженная и охарактеризованная в работе связь миссенс-мутаций гена *GhMYB10-A* в хромосоме A06 с окраской волокна хлопчатника важна для понимания этого механизма и создает основу для будущих исследований. Диссертант подробно объясняет выявленную дифференциальную экспрессию ключевых структурных (*GhDFR*, *GhANR* и *Gh4CL*) и регуляторных (*GhMYB1R1* и *GhMYB10-A*) генов биосинтеза пигментов на поздних стадиях развития волокна с 31 по 41 день после опыления в период визуального проявления пигментации и приходит к заключению, что у зеленовокнистых форм доминировала экспрессия генов *Gh4CL* и *GhMYB1R1*, указывая на активацию ранних этапов фенилпропаноидного метаболизма. У образцов с бурым волокном наблюдался повышенный уровень мРНК гена *GhMYB10-A* и структурных генов флавоноидного пути *GhDFR* и *GhANR*, что согласуется с накоплением проантоцианидинов. У образца с буро-зеленой окраской волокна зафиксирован одновременный повышенный уровень мРНК обоих регуляторных генов, что может отражать совместное накопление пигментов, обуславливающих данную окраску.

Заключение и Выводы сформулированы корректно, отражают достижение заявленной цели и решение поставленных задач, подкреплены полученными данными, обобщают полученные результаты и описывают дальнейшую перспективу их применения.

Замечания и рекомендации по работе:

1. В работе для идентификации генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* в геномах хлопчатника использовался поиск по гомологии нуклеотидных последовательностей, более правильным является поиск по последовательностям аминокислот, так как они более консервативны.

2. Для усиления предположения о функциональной значимости выявленных генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* имело смысл провести анализ их экспрессии на доступных транскриптомных данных, которые для хлопчатника представлены в большом количестве, в том числе для волокна.

3. Не рассматривался ли метод высокопроизводительного секвенирования ампликонов для определения последовательностей генов семейств *R2R3-MYB*, *bHLH-MYC* и *WD40* вместо секвенирование по Сэнгеру? Можно было бы охарактеризовать всю коллекцию окрашенных образцов хлопчатника.

4. При анализе экспрессии генов методом количественной ПЦР добавление 2-3 других тканей хлопчатника в качестве образцов сравнения позволило бы более полно охарактеризовать их экспрессию.

5. В Материалах и Методах в описании проведенных работ не везде хватает деталей, например, не для всех приложений и использованных баз данных указаны версии, на стр. 32 не приведены пороги, по которым отбирались гены в результате анализа гомологии, на стр. 36-37 не описано, в какой момент проводилось отделение волокна от коробочек.

6. В диссертации встречается некорректная избыточная точность при приведении некоторых значений, например, при оценке времени эволюционных событий на Рисунках 12-13 или статистической значимости в Приложении 23.

7. Функциональность выявленной мутации в гене *GhMYB10-A*, которая вероятно ответственна за формирование светло-бурой окраски волокна хлопчатника, в дальнейшем имело бы смысл подтвердить, например, скрещиванием.

Представленные комментарии ни в коей мере не умаляют высокую фундаментальную и практическую значимость работы.

Заклучение

Диссертация 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.» написана хорошим научным языком, логично структурирована, представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, результаты которого имеют теоретическое и практическое значение для понимания молекулярно-генетических механизмов формирования различной окраски волокна хлопчатника и развития маркер-ориентированной селекции этой ценной культуры. Изложенные результаты получены с

использованием современных методов генетики, молекулярной биологии и биоинформатики, их достоверность не вызывает сомнений. Выводы логично следуют из полученных результатов. Автореферат диссертации и публикации по теме работы, включая тезисы всероссийских и международных конференций, отражают основное содержание диссертации. Результаты работы опубликованы в 5 статьях, преимущественно в зарубежных высокорейтинговых журналах, что является высоким показателем. Кроме того, работы диссертанта удостоены ряда наград в рамках конференций, на которых они были представлены.

Диссертационная работа Михайловой Александры Сергеевны по научной и прикладной значимости, а также новизне результатов соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (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 – Михайлова Александра Сергеевна заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика.

Дмитриев Алексей Александрович

ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией сравнительной геномики и транскриптомики

кандидат биологических наук

03.01.03 – Молекулярная биология

Тел. +7(910)444-26-07

Эл. почта alex_245@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, ИМБ РАН

Тел. +7(499)135-23-11, +7(499)135-11-60

Эл. почта isinfo@eimb.ru

