

ОТЗЫВ

о диссертационной работе Добряковой Ксении Сергеевны «Молекулярно-филогенетическое исследование видов *Elymus* L. флоры России», представленной к защите в диссертационном совете Д 002.211.01 при ФГБНУ «Ботанический институт имени В.Л. Комарова РАН» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 - ботаника

Диссертация К.С. Добряковой является целенаправленным, исключительно современным исследованием в области молекулярной систематики, актуальным в плане решения фундаментальных проблем происхождения и родственных отношений видов, в частности применительно к видам рода *Elymus* L. sensu lato (Пырейник, в широком смысле), трибы *Triticeae* (Пшеницевые) семейства *Poaceae* (сем. Мятликовые или Злаки).

Автор диссертации справедливо отмечает, что пырейники — это, во-первых, ценный сельскохозяйственный ресурс, некоторые виды используются в качестве фуражных трав и для борьбы с эрозией почв, а с другой стороны, являются моделью для изучения видообразования и гибридизации, различных типов изменчивости, используется в качестве объекта для исследований в области биосистематики, филогении и цитогенетики. К.С. Добрякова особо подчеркивает, что родственные отношения между видами в пределах рода *Elymus* L. s. l. являются предметом дискуссий и по сей день. Именно в случае этого рода определение гербарных образцов сопряжено с неоднозначностью, связанной с отсутствием единых исследовательских подходов у отечественных и зарубежных систематиков. Привлечение методов молекулярной биологии, по мнению автора диссертации, открывает для ботаников принципиально новые возможности филогенетического анализа.

Исходя из вышесказанного, цели и задачи представленной к защите диссертации являются исключительно актуальными.

Диссертация К.С. Добряковой состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы. Основной материал изложен на 145 страницах машинописного текста и 20 страницах, занимаемых двумя приложениями, А и Б. Диссертация содержит 22 рисунка и 24 таблицы.

К сожалению в диссертации нет отдельной страницы со списком сокращений, который позволил бы сделать более оптимальным использование в тексте полных и сокращенных вариантов терминов и названий.

Во ВВЕДЕНИИ автор рассматривает актуальность и степень разработанности темы исследования, логично подводит к формулировке целей и задач. В этом вводном разделе К.С. Добрякова также останавливается на научной новизне работы, теоретической и практической значимости исследования, методологии и методах исследования, основных положениях, выносимых на защиту, приводит сведения об апробации работы и числе публикаций. По теме диссертации было опубликовано 10 работ, из них 2 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК.

Обращает на себя внимание тот факт, что ни в текст диссертации, ни в автореферат не включен раздел о личном вкладе автора в получение результатов и их анализ.

Глава 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ – посвящен характеристике и истории систематики видов рода *Elymus* L. Автор детально рассматривает основные методы и подходы, которые исторически были использованы в систематике рода *Elymus* L. К.С. Добрякова

очень подробно останавливается на использовании морфологических особенностей, характеристик геномов, проведении геномного анализа, а также использовании геном специфических молекулярных маркеров в систематике изучаемого в диссертации рода. Автор отмечает, что геномный анализ особенно важен в случае рода *Elymus* L., поскольку многие виды имеют гибридное происхождение и являются аллополиплоидами. Раздел 1.3, посвященный молекулярно-филогенетическому анализу и, по сути, являющийся теоретической основой экспериментальной части диссертации, изложен очень кратко и занимает 4 страницы. Автор по пунктам обосновывает преимущества использования нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 ядерного рибосомального цистрона 18S–5.8S–26S рДНК, а также первичной структуры ДНК хлоропластов, особенно интронов гена *trnL* и межгенного спейсера *trnL-trnF* для построения молекулярно-филогенетических гипотез. Такой дисбаланс разделов в обзоре литературы нуждается в пояснении со стороны диссертанта.

Глава 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ – написана очень подробно и последовательно в отношении исследованных видов и гибридов, перечень которых приведен в таблице 6, занимающей шесть страниц и насчитывающей 57 образцов. Следует, однако, отметить некоторые неточности в оформлении этой таблицы: В столбце, озаглавленном как «Вид, номер ваучера», информации о номере не приведено. Он помещен в конец текста отдельных строк таблицы в последнем столбце, содержащем сведения о местонахождении ваучера и прочее. Пять страниц занимает таблица 7, в которую помещена информация о последовательностях из Генбанка (GenBank), использованных для построения филогенетических деревьев и сравнительного анализа собственных результатов секвенирования. Достаточно подробно освещена методическая сторона проведенных исследований. Приведены протоколы для выделения, амплификации и анализа ДНК, а также описания использованных алгоритмов биоинформатики для построения филогенетических деревьев и сетей, а также моделирования вторичных структур 5.8S рРНК, ITS1 и ITS2. Кратко сообщено об определении числа хромосом.

Глава 3 – РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ – состоит из семи подразделов и посвящена: 1) общей характеристике внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2 *Elymus sensu lato* (s.l.) трибы *Triticeae*, которая включает такие параметры как длина амплифицированных фрагментов и содержание GC-пар; 2) влиянию мутаций в ITS1 и ITS2, накопившихся у видов *Elymus* s. l. в ходе их дивергенции, на вторичную структуру РНК-транскрипта; 3) связи вариаций последовательностей нуклеотидов и вторичной структуры 5.8S рРНК у видов *Elymus* s. l.; 4) выявлению полиморфных сайтов в ITS1 и ITS2 у предполагаемых гибридов *Elymus*; 5) сравнительному анализу изменчивости первичной структуры участка рибосомального цистрона ITS1-5.8S рДНК-ITS2 и определение генетических различий между видами (р-расстояний); 6) построению молекулярно филогенетических деревьев на основании сравнения последовательностей ITS1-5.8S рДНК-ITS2 и хлоропластной ДНК участка *trnL-trnF* видов *Elymus* s. l.; 7) определению чисел хромосом у некоторых видов *Elymus* и других видов трибы *Triticeae*.

К.С. Добрякова отмечает, что поддержание или ослабление вторичной структуры ITS1 и ITS2, связанное с изменением процентного содержания GC, является основой для стабилизирующего отбора. Автор пишет (стр. 77), что в ходе исследований (раздел 3.1) выявлены некоторые различия в GC-составе у видов разных родов, но четких межсекционных различий GC-состава участков ITS1, 5.8S рДНК и ITS2 у видов *Elymus* s. l. выявлено не было. Однако, было установлено, что среднее процентное содержание GC-пар ITS2 (65,1%) выше, чем в последовательностях ITS1 (62,7%) у видов клады А, но не у видов клады В, у последних оно не различается. Этот результат К.С. Добряковой не обсужден, хотя выше по тексту много внимания уделено сравнению содержания G+C у отдельных видов *Elymus* и нуклеотидных замен, которые могли привести к изменению этого показателя по сравнению с консенсусной последовательностью. Диссертантом

детально проанализированы изменчивые позиции в первичной структуре ITS-последовательностей у видов рода *Elymus*, образующих клады А, В и С молекулярно-филогенетических деревьев и показано, что при дивергенции видов преимущественно накапливаются мутации, не влияющие на вторичную структуру транскрипта ITS1 и ITS2. На стр. 73 (последний абзац) автор пишет, что высокое содержание GC может стабилизировать вторичную структуру РНК-транскрипта внутренних транскрибируемых спейсеров, т.к. между А и Т возникает две водородные связи, а между G и C – три. Корректнее было бы учесть замену Т на U в первичной структуре РНК. Ошибка в названии раздела 3.3, в котором значится «вторичная структура 5.8S рДНК» почему-то осталась невыправленной, хотя в первой же строке раздела говорится о вторичных структурах именно «рРНК». Достижением этого раздела диссертации является выявление таксономически значимого положения в гене 5.8S рДНК, которым по мнению К.С. Добряковой является позиция 136, в которой у большинства видов стоит С, а у видов близких к *E. dauricus* из Южной Кореи и из Китая в этой позиции прочитывается U. Наличие полиморфных сайтов в секвенированных нуклеотидных последовательностях ITS позволило диссертанту подтвердить предположения, ранее сделанные агробиологами, о гибридогенном происхождении отдельных представителей *Elymus* sp., что также является успехом автора. Генетические различия между видами, определяемые как отношение вариабельных нуклеотидов к общему числу нуклеотидов, в рассматриваемом случае в последовательностях ITS1-5.8S рДНК-ITS2, названо диссертантом генетическим расстоянием между видами (раздел 3.5), что не совсем корректно, так как генетическое расстояние — это устоявшийся термин, несущий другую смысловую нагрузку.

В разделе ЗАКЛЮЧЕНИЕ К.С. Добрякова лаконично и четко сводит воедино полученные данные и результаты их обсуждения. Автором впервые выявлены два семейства риботипов: типов ITS/типов рДНК, «северное» и «южное», и 6 вариантов хлоротипов. Установлено, что двум группам популяций *Elymus* aggr. *dahuricus*, северным и южным, свойственны контрастные типы последовательностей ITS, что позволило считать их генетически изолированными расами и надежно установить различия в их происхождении. Обработка результатов секвенирования последовательностей ITS и района *trnL-trnF* генома хлоропластов *Elymus* двумя различными методами, используемыми в геносистематике, позволило диссертанту показать, что распределение исследуемых образцов *Elymus* по ветвям филогенетического дерева не соответствует делению на секции, принятому в последних систематических обработках этого рода. К.С. Добрякова никак не обсуждает этот результат, ограничивается констатацией факта. Было бы интересно узнать, какую классификацию диссертант считает приоритетной и с чем могут быть связаны расхождения.

В целом диссертация написана четко, хорошим языком, с соблюдением правил употребления полных и сокращенных родовых и видовых названий, которыми избилует текст, однако, в первой строке таблицы 4 русский вариант названия не представлен в полной форме. Также вызывает вопросы, почему автор в каких-то случаях добавляет *sensu lato* (в «широком смысле») к названию рода *Elymus*, а в других — нет. Какой смысл вкладывается в добавление *sensu stricto* (в «узком» смысле) к названию рода. В последнем случае это дополнение присутствует в тексте всегда в сокращенной форме без расшифровки (стр. 13, 32, 108). Также можно обратить внимание автора на то, что индивидуальные растения не принято называть особями (стр. 108, 5 стр. снизу).

На фоне частных замечаний необходимо отметить, что в целом диссертация Добряковой К.С. представляет собой законченное исследование в области систематики и филогении, выполненное с применением самых современных методов. Особую значимость этому исследованию придаёт то, что в нем использована богатая коллекция гербарных образцов лаборатории биосистематики и цитологии БИН РАН и отдела

гербария БИН РАН, изучение которых вышло на новый молекулярный уровень. Результаты, обобщенные в диссертации, позволили сделать оригинальное заключение подтвердили гибридную природу образцов, которые считались отдаленными гибридами, положили начало новым направлениям работы в области молекулярной филогении и геносистематики.

Несмотря на шероховатости, отмеченные в тексте этого отзыва, диссертация К.С. Добряковой выполнена на высоком научном уровне, который отвечает международным стандартам молекулярной биологии и биоинформатики.

ВЫВОДЫ, сделанные в диссертации, обоснованы, достоверны, подкреплены достаточным фактическим материалом, однако представляют собой, в большой степени, краткое изложение результатов и обсуждения.

Материалы диссертации опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК. Автореферат правильно отражает содержание диссертации.

Экспериментальные данные и теоретические положения, полученные в диссертации, могут быть включены в курсы лекций для студентов-биологов, специализирующихся в области ботаники, генетики, молекулярной биологии и биоинформатики, в университетах и других высших учебных заведениях биологического и сельско-хозяйственного профиля. Исследования в этой области, проводимые в ФГБУН «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук», следует продолжать и развивать.

Диссертация К. С. Добряковой соответствует пунктам 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям согласно положению «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденному постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а её автор, Добрякова Ксения Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – ботаника.

Официальный оппонент
Михайлова Елена Игоревна
старший научный сотрудник

Санкт-Петербургский Филиал ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук, доктор биологических наук, доцент.

199034, Санкт-Петербург

Университетская наб. 7/9

Телефон: +7(812) 3636105 раб., +79215770152 моб.

Электронный адрес: emikhailova2010@gmail.com

23 января 2017 года

Подпись Е.И. Михайловой
Удостоверяю *ф.с.н.с.*

