

## 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.И. Комарова РАН» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – ботаника

Многолетние злаковые травы, к ним относится род *Elymus* L. (Пырейник), – ценный резерв полезных генов для улучшения возделываемых культур. Однако они остаются мало изученными. До сих пор нет единого мнения об объемах и границах рода Пырейник, родственных связях, входящих в него аллополиплоидных видов, их геномной конституции, степени межвидовой и внутривидовой дифференциации, уровне спонтанной гибридизации в природных условиях. Для уточнения филогенетических и геномных взаимосвязей между видами рода, распространенных на территории России и сопредельных стран, оценки характера их дивергенции, соискатель использовал современные методы молекулярной филогении, анализ широко опробованных в подобного рода исследованиях нуклеотидных последовательностей рибосомных генов, а именно участка ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома, и генов транспортных РНК (межгенного спейсера *trnL-trnF* и *trnL* интрона) хлоропластного генома. Тема диссертационной работы представляется чрезвычайно актуальной.

Научная новизна полученных лично соискателем результатов и сформулированных выводов состоит в том, что

- (1) впервые определены нуклеотидные последовательности участков ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома и *trnL-trnF* хлоропластного генома у представителей 10 видов трибы Triticeae и двух предполагаемых межвидовых гибридов, полученных с участием *Elymus*;
- (2) впервые получены сведения о внутривидовом, межвидовом и межродовом характерах изменчивости нуклеотидных последовательностей участков ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома и *trnL-trnF* хлоропластного генома на выборке изученных видов;
- (3) впервые показано наличие, по меньшей мере, трех вариантов хлоропластной ДНК у видов *Elymus*, распространенных на территории России;
- (4) уточнены филогенетические взаимосвязи в группе родственных видов *E. aggr. dahuricus*.

Значимость для науки и практики результатов, проведенных соискателем исследований, определяется:

- 1) получением новых знаний о характере внутривидовой, межвидовой и межродовой изменчивости нуклеотидных последовательностей участков ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома и *trnL-trnF* хлоропластного генома видов рода *Elymus* и других родов злаков;
- 2) идентификацией различных вариантов хлоропластной ДНК у видов рода *Elymus*, встречающихся на территории России;
- 3) уточнением филогенетического родства между видами *Elymus* и видами других родов;
- 4) обогащением международной базы данных NCBI GenBank сведениями об изученных нуклеотидных последовательностях;
- 5) расширением характеристик коллекции гербарных образцов видов *Elymus*, сохраняемой в России.

**Обоснованность и достоверность научных положений, сделанных диссертантом выводов и заключений достигается:**

- логично спланированными экспериментами;
- репрезентативностью изученной выборки гербарных образцов видов рода *Elymus*;
- использованием для проведения исследований адекватных цели и задачам методов молекулярной биотехнологии (выделение ДНК, проведение ПЦР амплификации, секвенирование, биоинформационный анализ);
- применением широко опробованных компьютерных программ, позволяющих работать и анализировать данные о нуклеотидных последовательностях;
- публикацией основных результатов диссертационной работы в рецензируемых отечественных журналах, рекомендованных ВАК, а также их обсуждением на многочисленных конференциях.

**Общая характеристика диссертационной работы и замечания.** Диссертация Добряковой Ксении Сергеевны представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Материал изложен на 165 стр. машинописного текста, включает введение, главы «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты и обсуждения». В конце имеется заключение, выводы, благодарности, список литературы и два Приложения. В одном из них приведены ITS последовательности у 65 исследованных представителей видов трибы *Triticeae* и других видов, в другом – нуклеотидные последовательности *trnL-trnF* участка хлоропластного генома 43 представителей видов этой трибы. Диссертация иллюстрирована 24 таблицами и 22 рисунками.

**Введение** написано в соответствии с требованиями ВАК РФ. В нем представлены все разделы, необходимые для общей оценки работы. Цель и задачи четко сформулированы.

**Глава 1** – «Обзор литературы», озаглавленная как «История изучения систематики рода *Elymus* L.» составлена на основе анализа 163 литературных источников, в том числе 115 – на английском языке. В ней дана краткая характеристика видов рода *Elymus*, методов, использованных в систематике этого рода, рассмотрены геномная конституция видов и характер их родства по данным анализа нуклеотидных последовательностей различных генов. Отдельный раздел посвящен морфологическому описанию видов, изученных в диссертации. В виде заключения описана существующая дифференциация видов *Elymus* в природе, пути возможных преобразований их геномов. В целом в обзоре литературы исчерпывающе показаны предпосылки выбора соискателем темы исследований и ее актуальность.

**В главе 2** рассмотрен использованный растительный материал, места его сбора. Таксономическое определение значительной части материала сделано соискателем вместе с соавторами. С достаточной степенью детализации описаны методика определения числа хромосом и методы выделения ДНК, проведения ПЦР, условия электрофореза в агарозном геле для определения амплифицированных фрагментов, а также техника секвенирования. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей, построения вторичных структур РНК и филогенетических деревьев применены различные компьютерные программы.

**В главе 3** представлены результаты собственных исследований соискателя, которые объединены в семь разделов. В них приведены сведения о варьировании по длине нуклеотидных последовательностей участков ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома и последовательностей транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, описан характер

изменений последовательностей, их влияние на вторичную структуру РНК-транскрипта, показано распределение вставок и делений, различного типа однонуклеотидных замен, наличие полиморфных сайтов у видов *Elymus* флоры России и некоторых других видов злаков. Эти результаты легли в основу вывода 2. При попарном сравнении представителей изученных видов этого и других родов рассчитаны генетические расстояния (р-расстояния) и определены филогенетические связи между видами. В дополнение к изученным участкам ITS1–ген 5.8S рРНК– ITS2 ядерного генома охарактеризованы ДНК последовательности генов транспортной РНК хлоропластного генома, а именно *trnL-trnF*, межгенного спейсера и *trnL* интрона. Используются также секвенированные последовательности этих участков, депонированные в базе GenBank. Соискателем установлено, что виды рода *Elymus* имеют, по меньшей мере, шесть вариантов хлоропластной ДНК, три из которых обнаружены у представителей флоры России (вывод 5). Следует отметить, что К.С. Добрякова не выявила каких-либо связей между существующим делением видов на секции или подсекции, а в случае с изученными последовательностями хлоропластного генома делением также на рода, и статистически поддержанными кладами построенных филогенетических деревьев, которые были показаны на основании сходства нуклеотидных последовательностей (выводы 1 и 5). К сожалению, какого-либо объяснения этому факту не дано. Предпринятое соискателем более детальное изучение группы родственных видов *E. aggr. dahuricus*, в котором сравнивались все известные ITS последовательности, дали возможность разделить эти виды на четыре группы в зависимости от вариантов рибосомной ДНК. Учитывая географическое происхождение большинства образцов, входящих в каждую группу, они условно были обозначены как Northern St-rDNA, Northern dahuricus St-rDNA, Southern St-rDNA и Southern dahuricus St-rDNA (выводы 3 и 4). Никак не объяснено, почему им даны названия только на английском языке? Без какой-либо связи с другими исследованиями в разделе 3.7 приведены сведения об определении хромосомных чисел у некоторых видов *Elymus* и видов других родов. Целесообразнее, их было бы рассмотреть вначале, при описании материала.

Диссертационная работа К.С. Добряковой логично построена, текст написан хорошим литературным языком, выверен, хотя в нем встречаются орфографические (с. 17, 25, 42) и синтаксические ошибки, пропуски (с. 15, табл. 1, описание растения и стебля; с. 53 – слово «Глава») и повторы слов (с. 14), неточности. Так, на с. 147 в Приложении А, пропущены сведения о представителе вида *E. amurensis* и двух представителях вида *E. caninus*. Отсутствует нумерация страниц, содержащих таблицы, которые даны в альбомном расположении. Остался открытым вопрос, сколько последовательностей секвенировал соискатель, поскольку в Приложении А приведены нуклеотидные последовательности у исследованных 49 представителей 33 видов пырейника и 15 представителей других родов, на с. 7 соискатель утверждает, что секвенировал 40 ITS последовательностей 29 видов *Elymus* и 5 – других родов, при этом на этой же странице указана также цифра 45 последовательностей, а на с. 53 в табл. 6 перечислены 40 последовательностей, но 26 видов и 5 – других родов? Аналогичные вопросы возникают и при рассмотрении секвенированных последовательностей *trnL-trnF* хлоропластного генома. В Приложении Б приведены 29 последовательностей 20 видов пырейника и 14 последовательностей 12 видов других родов. Однако в разделе «Научная новизна работы» написано о 19 последовательностях участка *trnL-trnF*, в положении 3, вынесенном на защиту, речь идет о 18 видах, в разделе «Степень достоверности и апробация работы» – о 17 последовательностях 15 видов, а с учетом депонированных последовательностей – о 29 участках *trnL-trnF* 12 видов. Хотелось бы получить разъяснения по этим вопросам. Кроме того, практически не рассмотрены результаты изучения продуктов полимеразной цепной реакции электрофорезом в агарозном геле. Из текста диссертации также не ясно, как определяли парсимонически значимые сайты в изученных нуклеотидных последовательностях?

В целом выполненные К.С. Добряковой эксперименты с применением современных молекулярно-генетических методов, несомненно, свидетельствуют о хорошей методической подготовке диссертанта, вынесенные им на защиту положения и сформулированные выводы базируются на достоверном экспериментальном материале. Сданные в отзыве замечания существенного негативного влияния на общую высокую оценку проведенных исследований не оказывают, они касаются формы изложения материала и представления полученных данных. **Автореферат и печатные работы в полном объеме отражают содержание диссертации.**

**Рекомендации по использованию результатов работы.** Научные разработки соискателя целесообразно использовать в различных учреждениях ФАНО, изучающих злаки: Федеральном исследовательском центре Всероссийском институте генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Федеральном исследовательском центре Институте цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск), ФГБНУ Институте общей генетики имени Н.И. Вавилова (Москва), Ботанических садах России, а также в учебных курсах по ботанике и генетике в Санкт-Петербургском, Новосибирском, Южном и других университетах РФ.

### Заключение

Диссертационная работа «Молекулярно-филогенетическое исследование видов *Elymus* L. флоры России» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842. Она представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, в которой впервые охарактеризованы нуклеотидные последовательности участков ITS1–ген 5.8S рРНК–ITS2 ядерного генома и *trnL-trnF* хлоропластного генома у представителей различных видов *Elymus* флоры России, уточнены степень и характер дивергенции и родства видов по этим участкам. Автор диссертационной работы Добрякова Ксения Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – ботаника.

Официальный оппонент

Митрофанова Ольга Павловна,

главный научный сотрудник, зав. отделом генетических ресурсов пшеницы ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), доктор биол. наук, старший научный сотрудник.

190000 Санкт-Петербург, Большая Морская 42, 44

Телефон: 8(812)-571-73-22 раб.; +79633415850 мобил.

Электронный адрес: [o.mitrofanova@vir.nw.ru](mailto:o.mitrofanova@vir.nw.ru)

16 января 2017 г.

