

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Кузнецовой Ксении Андреевны на тему: «Система WOX-CLAVATA и ее мишени в регуляции развития запасающего корня и спонтанных опухолей у редиса посевного (*Raphanus sativus* L.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.

Генетика

### **Актуальность избранной темы**

Корнеплодные культуры являются одними из важнейших сельскохозяйственных растений, и изучение механизмов развития запасающего корня в настоящий момент является значимым для решения задач генетики растений.

Редис – перспективный модельный объект для изучения генетики развития запасающего корня, так как имеет небольшую площадь питания, неприхотлив, и обладает коротким жизненным циклом. Данная работа вносит вклад в изучение функций генов-регуляторов развития запасающего корня, которые могут быть использованы как мишени для геномного редактирования при создании улучшенных форм корнеплодных культур. Исходя из вышесказанного актуальность данной работы не вызывает сомнения.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

Изучение генетических механизмов развития запасающего корня в настоящий момент находится на начальном этапе исследований, поэтому многие вопросы в данной работе были раскрыты впервые. В раскрытие данного вопроса в частности использовалось изучение спонтанных опухолей, что является оригинальным подходом и неоспоримой новизной. В данной работе впервые были получены сборки геномов родственных опухолеобразующей и безопухолевой линий редиса. Впервые были выявлены однонуклеотидные замены (SNP), инсерции и делеции (InDels), различающие линии редиса, контрастные по способности к спонтанному опухолеобразованию. В полученных сборках геномов были идентифицированы гены-регуляторы развития меристем, проведен анализ последовательностей их продуктов. Впервые был проведен транскриптомный анализ растений со сверхэкспрессией гена *RsCLE41-1*. Впервые была выявлена вероятная прямая мишень транскрипционного фактора *RsWOX4*, играющего центральную роль в контроле активности камбия – ген *RsLOG3*, кодирующий фермент биосинтеза цитокининов. Таким образом, работа характеризуется высокой степенью научной новизны.

Данная работа имеет практическую ценность, так как в ней был осуществлен поиск новых генов-кандидатов на роль регуляторов развития запасающего корня на модели редиса посевного. Для этого был осуществлен анализ анатомии корня в связи с экспрессией генов-регуляторов развития камбия, что позволило получить данные об их роли в развитии запасающего корня. Важным результатом является выявление гена-мишени основного регулятора активности камбия, кодирующий фермент биосинтеза цитокининов. Гены *RsWOX4* и *RsLOG3*, а также их гомологи у других корнеплодных растений – кандидаты для геномного редактирования, направленного на улучшение важных для сельского хозяйства признаков.

Теоретическая значимость результатов работы заключается в идентификации и анализе последовательностей генов семейств *RsCLE* и *RsWOX* редиса и изучении функций

определенных представителей этих генных семейств, а также их вероятных генов-мишеней, что вносит вклад в область генетики развития растений, а так же, что с использованием секвенирования и сравнительного анализа геномов опухолевой и безопухолевой родственных инбредных линий редиса были выявлены генов-кандидаты на роль регуляторов спонтанного опухолеобразования и системного контроля деления клеток.

### **Основное содержание**

Диссертационная работа изложена на 203 страницах и состоит из введения, четырех глав и выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа содержит 40 рисунков и 7 таблиц. Список литературы содержит 585 наименований.

Глава 1 «Обзор литературы» написана хорошим литературным языком и полностью охватывает круг задач, которые в процессе диссертации решает автор. Обзор затрагивает регуляцию образования разных типов латеральных меристем, описывает факторы, влияющие на формирование запасяющего корня и описывает особенности редиса, как объекта для изучения генетики развития запасяющего корня.

Однако, замечены неточности, так на стр 42 лигнин называют смесью полимеров, что, по нашему мнению, не совсем точно, так как это гетерополимер, трудно растворимый даже в серной кислоте, он откладывается в клеточной стенке, что приводит к увеличению ее прочности, но при этом снижается эластичность. Возможно этим и вызвано меньшее утолщение запасяющих корней у трансгенного батата с повышенным уровнем экспрессии лигнинов. На стр 44 говорится, что рост запасяющего корня редиса позитивно регулируется фотопериодом, подобное утверждение повторяется и на стр 46.

Поэтому возникает вопрос: Как Вы объясните, то что при длинном дне большинство форм не образуют корнеплод, а сразу переходят к цветению, что мы можем наблюдать при посеве в середине мая на территории Ленинградской области?

Глава 2 «Материал и методы» написана достаточно подробно хорошо характеризует материал, используемый в работе и охватывает весь спектр используемых в ней методов.

Однако основные линии л18 и л19 охарактеризованы недостаточно. Так только в гл.3.1. было сказано, что линии также различаются не только по опухолеобразованию, но и по другим признакам (форме корнеплода, росту, опушенности листа и т.д.).

Также упущением главы следует отметить отсутствие ссылки на номер референсного генома редиса, на котором осуществлялось выявление генов кандидатов.

Глава 3 Результаты состоит из 5 подглав.

Подглава 3.1. Описывает различия между сборками двух геномов – линий 18 и 19, различающихся по способности к опухолеобразованию. Был проанализирован большой объем материала. Показано, что опухолеобразующая линия отличается наличием 72 InDels и 36 SNP, приводящих к нарушению рамки считывания. Все гены, в которых были обнаружены мутации были систематизированы и картированы. Показано, что эти гены (не аллели?) экспрессировались, а некоторые даже обладали дифференциальной экспрессией в опухолевых, по сравнению с неопухолевыми корнями одного генотипа. Однако, в силу большого объема работы автор не рассмотрел возможности наличия гомологов этих генов, возможно имеющих в геноме. Многие из этих генов у арабидопсиса приводят к видимым изменениям, по крайней мере эти гены, по моему мнению, можно было бы проверить на наличие функциональных копий в геноме.

Подглава 3.2. посвящена идентификации и анализ последовательности генов *RsWOX* и *RsCLE* и предсказанию доменной структуры кодируемых ими белков. В ней подробно описаны и обоснованы все этапы проведенной работы.

Подглава 3.3. посвящена изучению влияния генов *RsWOX4*, *RsWOX14* и *RsCLE41* на развитие корнеплода и экспрессию генов редиса. На основе анализа генных сетей было высказано предположение, сверхэкспрессия *RsCLE41-1* приводит к активации путей, помогающих растениям повысить свою устойчивость к засухе, что на наш взгляд согласуется с изначальной функцией запасующего корня у растений – запас веществ для переживания неблагоприятных условий, в основном засухи. Т.е. найден один из «генов доместикации». Т.е. вывод по данной главе может быть более глобальным.

На композитных растениях было показано, что при сверхэкспрессии генов *RsWOX4*, *RsWOX14* стела корня из диархной становилась триархной, увеличивалось число клеток камбия и как следствие – клеток ксилемы. Однако, не всегда понятно о каком из двух *RsWOX4* идет речь, вероятней всего о *RsWOX4-2*.

Поэтому вопрос: почему был взят *RsWOX4-2*, а не *RsWOX4-1*, и чем они различаются?

Подглава 3.4 «Поиск мишеней транскрипционных факторов *RsWOX4* и *RsWOX14*» приводит результаты *in silico* выявления генов кандидатов и количественный анализ их экспрессии у композитных по ТФ растений, а также подтверждение их прямого взаимодействия на уровне гомеодомена *RsWOX4* с промоторами генов-кандидатов с помощью дрожжевой одногибридной системы. Данная глава может служить хорошим примером прохождения всех этапов от формирования гипотезы взаимодействия генов до ее доказательства на молекулярном уровне.

По результатам этой подглавы возникает вопрос, не смотрели ли анатомию корня композитного растения с сайленсингом гена *RsWOX4-2*? Какое у него было количество клеток камбия и ксилемы по сравнению с диким типом?

Подглава 3.5. Суммирует основные результаты приведенные в других подглавах главы 3 и является ее логическим заключением.

Глава 4. «Обсуждение» – приводит обобщение результатов, находит связи с ранними исследованиями, показывает дальнейшие перспективы решения проблем формирования запасного корня и его опухлеобразования. В конце приведена схема суммирующая возможные пути взаимодействия генов компонентов системы *WOX-CLAVATA* в развитии запасующего корня редиса. Это схема, прочитавшему диссертацию понятно объясняет все контролируемые этими генами процессы, однако с формальной точки зрения не хватает пояснений к чему относится «потеря воды» (уменьшение потери воды?) и «АБК» (увеличение синтеза АБК?), чтобы по этой схеме было ясно и не читавшему диссертацию, как происходит влияние.

Выводы сформулированы ясно и отражают проделанную работу.

Все сделанные замечания не умоляют достоинств работы.

## **Заключение**

Представленное исследование выполнено на высоком научно-методическом уровне и соответствует мировым стандартам в области генетики. Работа имеет огромное значение для фундаментальной и прикладной науки. Ее результаты по достоинству оценены научным сообществом. Обоснованность научных положений и рекомендаций,

сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Основные результаты работы представлены в виде докладов на международных конференциях и научных статей в престижных журналах, индексируемых Wos и Scopus.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Кузнецовой Ксении Андреевны на тему: «Система WOX-CLAVATA и ее мишени в регуляции развития запасяющего корня и спонтанных опухолей у редиса посевного (*Raphanus sativus* L.)» соответствует специальности 1.5.7. Генетика.

Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи – генетического контроля формирования запасяющего корня, имеющей значение для развития генетики растений,

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено.

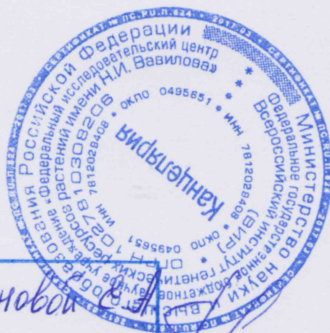
Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета, доктор биологических наук (03.02.07 – Генетика, 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений), ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов масличных и прядильных культур Федерального исследовательского центра Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская 42-44, т. (812) 314-78-36, e-mail. e.porohovinova@vir.nw.ru

*Порох*

Пороховинова  
Елизавета Александровна

9 января 2025г.



Подпись *Е.А. Пороховинова*  
УДОСТОВЕРЯЕТСЯ  
Зав. канцелярией ВИР

*Порох*  
*Порох*