

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федянин

2025 г



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Кузнецовой Ксении Андреевны «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 специальности 1.5.7 – Генетика

Актуальность диссертации

Диссертационная работа посвящена изучению генетического контроля процесса формирования запасающего корня у хозяйственно ценного вида редиса посевного, а также выяснение причин развития спонтанных опухолей, не связанных с инфицированием растений. Вопросы генетики развития запасающих корней у растений начали активно изучаться лишь в последнее десятилетие, причем генетики СПбГУ являются одними из лидеров в данной области исследований. Изучение функций генов-регуляторов системы *WOX – CLAVATA* в процессе роста и развития корня у редиса посевного (*Raphanus sativus* L.) с использованием самых современных подходов генетики и молекулярной биологии является важной составной частью этих приоритетных исследований. Результаты работы значительно углубляют представления о генетическом контроле вторичного роста, приводящего к развитию запасающего корня и аномалиям меристематической активности, приводящим к спонтанному опухолеобразованию. Актуальность диссертационной работы К.А. Кузнецовой связана также с использованием уникальных объектов исследования. Созданная и поддерживаемая несколькими поколениями генетиков коллекция высокоинбредных линий редиса позволила диссертанту впервые начать исследование природы спонтанного опухолеобразования у редиса путем секвенирования и сравнительного анализа геномов опухолевой и безопухолевой родственных линий из этой коллекции. Сравнительный анализ родственных высокоинбредных линий является гарантией получения достоверных результатов и достижения главной цели диссертации.

Отметим также, что изучение генетического контроля формирования запасающего корня у редиса посевного является актуальной задачей для практического сельского хозяйства, поскольку данные, полученные на редисе, могут быть экстраполированы на другие сельскохозяйственные культуры с запасающим корнем.

Научная новизна исследования

Диссертационная работа отличается высоким уровнем научной новизны. Особенно ценным новым результатом является секвенирование и сборка геномов двух

близкородственных линий генетической коллекции редиса СПбГУ, различающихся по способности к спонтанному опухолеобразованию, и их сравнительный анализ. Диссертанту удалось выявить у опухолевой линии более 100 генов с инсерциями/делециями или с однонуклеотидными заменами в кодирующих областях и сайтах сплайсинга, среди которых обнаружены важные регуляторные гены, действующие в разных программах развития растений, в том числе – в программах развития меристем запасяющего корня (гены семейств *WOX* и *CLE*). 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 диссертанта характеризуется высокой степенью научной новизны.

Практическая и теоретическая значимость работы.

Изучение генетических механизмов, лежащих в основе развития запасяющего корня редиса, имеет как практическое значение в связи с важным вкладом корнеплодных сельскохозяйственных культур в питание человека и животных, так и теоретическое значение - в отношении получения новых данных о механизмах регуляции латеральных и нерегулярных меристем корня. Результаты диссертационной работы, закономерности генетической регуляции развития запасяющего корня, выявленные на редисе, могут быть использованы для селекции других корнеплодных культур, поскольку главные генетические модули, управляющие развитием растений, показывают высокую эволюционную консервативность.

Результаты работы расширили понимание роли регуляторного модуля *WOX-CLAVATA* в развитии растений и, в частности, при формировании запасяющего корня. 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. Секвенирование и сравнительный анализ геномов опухолевой и безопухолевой родственных линий редиса дают возможность для выявления генов-кандидатов на роль регуляторов спонтанного опухолеобразования и системного контроля деления клеток.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Кузнецовой К.А. изложена на 203 страницах, содержит 40 рисунков и 7 таблиц, в списке цитируемой литературы представлены 585 источников. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, заключения, обсуждения и выводов. В диссертации имеется и небольшое приложение.

Во введении автор кратко описывает изучаемую проблему, обосновывает актуальность, научную новизну проведенных исследований и практическую значимость данной работы, формулирует цель и задачи работы.

Обзор литературы (57 стр.) является компетентным и хорошо иллюстрированным введением в экспериментальную часть работы. Важное место в обзоре уделено рассмотрению всей имеющейся информации о причинах опухолеобразования у растений, которые могут вызываться не только заражением, но и быть генетически обусловленными. Важным выводом из этого анализа является вывод о малоизученности природы таких спонтанных опухолей, что подчеркивает актуальность проведенного диссертантом исследования. Обзор заканчивается кратким заключением, в котором диссертант суммирует результаты анализа литературы и приходит к выводу о вероятном сходстве генетического контроля опухолеобразования и развития запасяющего корня, в котором принимают участие меристемные регуляторы активности меристем. Таким образом, исследуя молекулярно-генетические механизмы развития запасяющего корня у безопухолевой и опухолеобразующей линий можно одновременно осуществить и поиск регуляторов спонтанного опухолеобразования.

В разделе «Материалы и методы» (15 страниц) диссертантом подробно описаны методы, использованные при выполнении работы. Их разнообразие и новизна свидетельствуют о самом высоком научном уровне проведенных исследований.

Раздел «Результаты и обсуждения» состоит из нескольких подразделов. Первый – посвящен анализу геномов двух линий генетической коллекции редиса, контрастных по способности к спонтанному опухолеобразованию, и идентификации генов, содержащих SNV, влияющие на последовательность кодируемых белков. Результатом этой работы явилась идентификация у опухолеобразующей линии 108 генов с нарушениями, среди которых диссертантом обнаружено много генов-регуляторов развития растений. Выявление таких предположительных генов-кандидатов опухолеобразования представляет собой важнейший результат работы и солидный задел для дальнейшего изучения генов спонтанного образования опухолей. Отметим, что К.А.Кузнецова все же не остановилась исключительно на выявлении этих кандидатов, но начала их предварительный анализ и показала, что все 108 генов с SNV у опухолевой линии 19 экспрессировались в корнеплодах, а 5 генов с такими SNV - дифференциально экспрессировались в опухолях. Среди таких генов оказался камбий-ассоциированный ген ответа на этилен *RsERF018*, изменения в котором обнаружены у большинства опухолевых линий. Поскольку *RsERF018* является мишенью ТФ WOX4, его выявление как наиболее вероятного регулятора опухолеобразования - важный результат работы.

Второй раздел посвящен анализу последовательностей генов *RsWOX* и *RsCLE* редиса и предсказанию доменной структуры кодируемых ими белков. Диссертанту удалось идентифицировать 24 гена семейства WOX и 52 гена семейства CLE и определить их хромосомную локализацию.

Важные результаты получены и по изучению влияния генов *RsWOX4*, *RsWOX14* и *RsCLE41* на развитие корнеплода и экспрессию генов редиса. Для изучения роли компонентов систем WOX-CLAVATA в развитии запасяющего корня у редиса были изучены эффекты сверхэкспрессии соответствующих генов на фенотип корня и профиль экспрессии предполагаемых генов-мишеней. Анализ транскриптома линии редиса с оверэкспрессией гена *RsCLE41-1* выявил новые предполагаемые мишени сигнального пептида *RsCLE41* (в общей сложности 62 дифференциально экспрессирующихся гена по

сравнению с контрольными корнями). Показано, что сверхэкспрессия генов *RsWOX14* и *RsWOX4* вызывает изменение строения стелы корня и увеличение числа клеток вторичной ксилемы.

Поиск возможных мишеней ТФ *RsWOX4* и *RsWOX14* проводился как *in silico*, так и с помощью ПЦР-РВ и дрожжевой одногибридной системы. Причем, для оценки уровней экспрессии предполагаемых генов-мишеней ТФ *RsWOX4* использовали корни «композитных» растений со сверхэкспрессией и сайленсингом гена *RsWOX4* и контрольные корни. Эти исследования позволили выявить новые предполагаемые мишени транскрипционного фактора *RsWOX4* и в экспериментах с использованием дрожжевой одногибридной системой показать наличие взаимодействия между гомеодоменом *WOX4* и ТААТСС-сайтом в промоторе гена *RsLOG3*, регулирующего последний этап биосинтеза свободных цитокининов.

В заключении и обсуждении автор обобщает полученные результаты и обсуждает их значимость с точки зрения дальнейшего анализа проблемы регуляции развития запасающего корня и аномальной меристематической активности, приводящей к спонтанному опухолеобразованию.

Выводы, сделанные из очень объемной и трудоемкой работы, отличаются четкостью и конкретикой. Все выводы, также как и положения, вынесенные на защиту, полностью аргументированы и экспериментально подтверждены. Выводы полностью соответствуют поставленным целям и задачам, их достоверность не вызывает никаких сомнений.

Степень достоверности и апробация результатов

Все представленные в работе результаты обоснованы и достоверны, поскольку получены с использованием самых современных и эффективных методов генетики и молекулярной биологии с использованием биологических повторностей и статистической обработки. Для проверки достоверности результатов, полученных с применением разных подходов, диссертант использовал тот комплекс статистических методов, который соответствует данному подходу и доказал свою надежность в предыдущих исследованиях. Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 6 международных конференциях и опубликованы в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях.

Недостатки работы

Работа написана очень хорошо, и к ее смысловой части есть лишь несколько замечаний, включая замечания 1 и 2, связанные между собой:

1. Среди генов, отличающих опухолеобразующую и безопухолевую линии, были обнаружены гены *WOX2*, *WOX14*, *CLE7*. Однако К.А.Кузнецова не считает возможным рассматривать их в качестве кандидатов на роль регуляторов опухолеобразования, поскольку этих генов, по-видимому, не были среди дифференциально экспрессирующихся (стр.114 со ссылкой на работу Tkachenko et al., 2021a) и поскольку некоторые из мутаций (но не все сразу) были обнаружены у других безопухолевых линий (обоснование на

стр.116, рис.21). На наш взгляд, ни отсутствие различий в уровне экспрессии этих генов в опухолеобразующей и безопухолевой линии, ни сравнение нуклеотидных последовательностей генов в других линиях не могут исключить совместное участие этих генов в образовании опухолей. Если бы эти гены наряду с *ERF018* были включены в вывод №2 в качестве генов – кандидатов, работа стала бы более цельной, и первая очень важная часть сравнительного анализа геномов линий, контрастных по способности к спонтанному опухолеобразованию, выглядела бы более связанной с названием диссертационной работы и с ее второй частью.

2. К.А.Кузнецова путем сравнительного анализа геномов линий, контрастных по способности к спонтанному опухолеобразованию, не только выявила 108 генов, которые содержат значимые мутационные изменения в опухолеобразующей линии, но и проделала большую очень важную работу по многостороннему анализу всех генов, направленную на обнаружение генов-кандидатов опухолеобразования. Однако эта важная часть исследований не отражена в задачах. О том, что она не отражена в выводах, указано в первом замечании.

3. В работе были получены «компаративные» растения с трансформированными корнями, которые должны демонстрировать сверхэкспрессию генов *RsCLE41*, *RsWOX4*, *RsWOX14*, а также снижение экспрессии гена *RsWOX4-2*. Однако результаты, доказывающие, что необходимое изменение экспрессии в этих растениях действительно присутствует, в представленной работе мы не обнаружили.

В качестве технических замечаний следует отметить часто встречается выражение «литературные данные», которое следовало бы заменить на «данные литературы». Отметим также отсутствие достаточной для понимания подписи к рис. 3, который состоит из нескольких частей (стр. 35). В подписи автор сообщает, что подробности можно найти в тексте, однако они там отсутствуют.

Заключение по работе

В заключении следует отметить, что сделанные замечания не снижают научной и практической ценности проделанной работы. Диссертационная работа К.А.Кузнецовой - это первая масштабная работа по анализу геномов растений со спонтанным опухолеобразованием. Впервые сравнение геномов двух инбредных линий генетической коллекции редиса, контрастных по способности к спонтанному опухолеобразованию, позволило выявить ряд генетических различий, которые потенциально могут вызывать образование опухолей путем влияния на активность вторичных меристем. Этот новый результат открывает дальнейшие перспективы для изучения генетики опухолеобразования у растений - проблемы, которая практически еще не исследована.

Автором проведена большая квалифицированная работа по выявлению мишеней *RsCLE41*, изучению влияния ТФ-регуляторов камбия *WOX4* и *WOX14* на развитие корня редиса и поиску прямых мишеней ТФ *WOX4* - центрального регулятора активности камбия. Все представленные в работе результаты обладают высокой степенью научной

новизны; достоверность результатов, а также обоснованность выводов работы, не вызывают сомнения.

Все основные результаты работы опубликованы и апробированы. Несомненно, что проделанная работа представляет собой законченное научное исследование и соответствует требованиям п.9-11,13,14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 1.5.7 – Генетика

Отзыв ведущей организации заслушан и утвержден на заседании кафедры генетики биофака МГУ имени М.В.Ломоносова (протокол № 05-24 от 23.12.2024 г).

Отзыв подготовил:
Д.б.н, профессор кафедры генетики
биологического ф-та МГУ



Татьяна Анатольевна Ежова

Сведения о составителе отзыва:

Ежова Татьяна Анатольевна - доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика, профессор кафедры генетики Московского государственного университета, звание – профессор.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1.
Тел. 8 (495) 939-27-29. WWW: www.msu.ru E-mail: info@rector.msu.ru

