

Отзыв официального оппонента

на диссертацию

Добряковой Ксении Сергеевны

**"МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ВИДОВ *ELYMUS* L. ФЛОРЫ РОССИИ"**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальностям 03.02.07 – генетика и 03.02.01 – ботаника

Диссертация Ксении Сергеевны Добряковой посвящена исследованию филогенетических отношений видов рода *Elymus* флоры России, выявляемых с использованием молекулярно-генетических маркеров. Актуальность работы не вызывает никаких сомнений, так как род *Elymus* – один из наиболее таксономически сложных родов трибы Triticeae. По поводу систематики и филогенетических связей представителей этого рода в российской флоре существует множество противоречащих друг другу точек зрения, поэтому попытка прояснить эти вопросы, несомненно, вполне своевременна. Целью работы являлось выяснение родственных связей между видами *Elymus* с использованием молекулярно-филогенетических методов.

Диссертация изложена на 145 страницах и состоит из Введения, трех глав, выводов и списка литературы, включающего 208 источников, в т.ч. 146 на иностранных языках. Работа содержит 24 таблицы и проиллюстрирована 22 рисунками. Три таблицы и 1 рисунок приведены в Приложениях 1-4.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Глава состоит из нескольких разделов, первый из которых посвящен краткой характеристике рода, его морфологии, аллополиплоидной геномной конституции входящих в него видов; проводится сравнение с близкими родами. Приведена таблица сравнения морфологических признаков *Elymus* с наиболее близким к нему родом *Elytrigia*. Во втором разделе главы кратко рассмотрены основные представления о систематике рода, полученные на основании изучения морфологических признаков, данных цитогенетики и

гибридологического анализа полиплоидов. Автор указывает, что диплоиды в роде *Elymus* неизвестны и он целиком имеет аллополиплоидную природу. В дальнейшем автор опирается, в основном, на систему рода, предложенную Н.Н. Цвелевым и Н.С. Пробатовой (2010), которая приводится в таблице 2. Третий раздел обзора посвящен рассмотрению систем молекулярно-генетических маркеров, используемых в систематике и филогенетике растений, в том числе и применительно к трибе Triticeae и роду *Elymus*, в частности. Наиболее подробно рассмотрено строение рибосомального оперона. В четвертом разделе обзора литературы автор более подробно рассматривает эволюцию представлений о геномной конституции *Elymus* и близких родов трибы пшеницевые, в т.ч. и существующие представления об аллополиплоидном возникновении этого рода. Более подробно Ксения Сергеевна останавливается на рассмотрении состава и характеристике видов *Elymus* с геномными формулами StH и StY, которые в дальнейшем, собственно, и стали предметом исследования в данной диссертационной работе. Здесь приводятся молекулярно-филогенетические деревья, полученные другими авторами по данным двух малокопийных ядерных генов и ядерных ITS. В заключительном разделе главы Ксения Сергеевна обсуждает существующие концепции вида, в т.ч. у полиплоидов и конкретно применительно к роду *Elymus*, наиболее подробно рассматривая здесь представления Р.В. Камелина.

В целом, представленный обзор выглядит весьма полным и свидетельствует о хорошем знакомстве автора работы с существующей литературой по систематике, генетике и молекулярной филогенетике злаков. Некоторым диссонансом в этом обзоре звучит самый последний абзац, посвященный распространению полиплоидии у животных, который не имеет никакого отношения к теме диссертации и, безусловно, не может претендовать на хоть какую-то полноту рассмотрения этого вопроса.

Глава 2 диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. Работа основана на гербарном материале, хранящемся в лаборатории Биосистематики и цитологии БИН РАН и в основном фонде Гербария БИН (LE). Всего было использовано 40 образцов 27 видов *Elymus* и 5 видов других родов трибы Triticeae (*Elyhordeum*, *Elytrigia*, *Psathyrostachys* и *Agropyron*) для

секвенирования ядерных ITS, а также 16 образцов 14 видов *Elymus* и 2 видов *Agropyron* для секвенирования хлоропластного спейсера *trnL-trnF*. Для целей молекулярно-филогенетического анализа эти данные были дополнены последовательностями видов *Elymus* и других родов, доступными в GenBank. Географически изученные образцы охватывают территорию Кавказа, Алтая, Южного Приморья и СВ Сибири. Последовательности из GenBank соответствуют образцам из Китая и Пакистана. Надежность определения видовой принадлежности образцов, использованных автором, велика, так как эти определения подтверждены крупнейшим отечественным специалистом по систематике злаков Н.Н. Цвелевым.

В последующих разделах главы автор подробно (иногда излишне подробно) описывает лабораторные методики извлечения ДНК из растительного материала, проведения ПЦР, секвенирования и анализа полученных последовательностей. Так, подробно описывать процедуру извлечения ДНК из растительных тканей по Doyle & Doyle (1987) было, на мой взгляд, совершенно излишне, также как и приводить в деталях протокол очистки ПЦР-продукта из агарозного геля.

К сожалению, автор не предприняла попытки клонирования последовательностей ITS, полученных из полиплоидных *Elymus*, оказавшихся гетерозиготами. Это не позволило ей в дальнейшем выдвинуть более детальные гипотезы об их происхождении. Вызывает некоторое удивление и небольшое число образцов, из которых были получены последовательности хлоропластного генома. Автору, конечно, следовало получить их из всех образцов, у которых были изучены ядерные последовательности. Кроме того, помимо участка *trnL-trnF* следовало секвенировать и несколько других участков хлоропластного генома, тем более, что они использовались другими авторами для реконструкции филогении *Elymus* и упомянуты в литературном обзоре. Это позволило бы повысить разрешение деревьев, построенных по хлоропластным данным.

В главе также описаны методы построения деревьев и сетей, методы построения вторичных структур рибосомальной РНК и методы определения числа хромосом у нескольких образцов *Elymus*. Сами числа хромосом, приведенные здесь вместе с подробными этикетками образцов, следовало привести в соответствующем разделе следующей главы, описывающей результаты исследования. Методы

построения деревьев и соответствующие компьютерные программы вполне адекватны поставленным задачам работы. Здесь можно все же сделать некоторые замечания. Так, автор пишет, что для построения дерева методом Байеса в программе MrBayes 3.2.2 была использована модель GTR+I+G, однако ничего не сказано, почему была выбрана именно эта модель. Также утверждается, что алгоритм NeighborNet, реализованный в программе SplitsTree4, предложен «для исследования сетчатой эволюции» (стр. 8 автореферата) и улавливает «внутренне-противоречивые филогенетические сигналы в выборке последовательностей, отражающие, в частности, обмен генетической информацией между разными природными популяциями и видами» (стр. 62). Это не вполне так. Алгоритм NeighborNet строит сеть, которая называется сплит-граф. Такого типа сети показывают несколько возможных с разной степенью вероятности способов группирования последовательностей ДНК, так называемых «сплитов», или способов разделения массива данных на группы. Фактически, они отражают не сетчатую эволюцию, как таковую, а всего лишь присутствующие в данных гомоплазии.

Методы построения вторичных структур рибосомальной РНК следовало охарактеризовать более подробно; в работе, фактически, просто приводится ссылка на интернет-ресурс и алгоритм, оценивающий вероятное строение таких структур.

Глава 3 диссертации посвящена описанию и обсуждению полученных результатов. В разделе 3.1 очень подробно рассматриваются общие характеристики последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомальной ДНК ITS1 и ITS2, в частности, их нуклеотидный состав. К сожалению, нигде не указано суммарно, сколько в выравнивании было переменных парсимонически информативных позиций и синглетов, и в скольких позициях наблюдался полиморфизм, свидетельствующий о присутствии в геноме нескольких различных копий ITS. Отчасти это компенсировано подробным разбором всех замен и делеций и их влияния на вторичную структуру РНК-транскриптов ITS1 и ITS2, приведенном в разделе 3.2 (раздел 3.3. в автореферате). Рассматривая частоты транзиций и трансверсий в указанных спейсерах рибосомальной ДНК, автор установила, что их отношение R отклоняется от теоретически ожидаемого значения $R=0,5$. Фактически, в среднем, отношение частоты транзиций к частоте трансверсий в исследованных

последовательностях оказалось равным $R=1,5$ для ITS1 и $R=1,4$ для ITS2. Такой результат автор интерпретирует, как свидетельство стабилизирующей роли отбора в пользу транзиций. Подобная интерпретация не вполне понятна: как увеличение доли транзиций в три раза по сравнению с ожидаемой может свидетельствовать о наличии стабилизирующего отбора в их пользу?

Следует отметить, что подразделения данной главы в тексте диссертации и в автореферате не совпадают, в основном тексте их больше и они расположены в несколько иной последовательности.

В разделе 3.3 диссертации рассмотрено влияние замен на вторичную структуру 5,8S РНК. В автореферате этот раздел отсутствует.

В целом, проведенный автором анализ вероятной вторичной структуры РНК-транскриптов представляет несомненный интерес и может быть использован при оценке филогенетических реконструкций. К сожалению, Ксения Сергеевна нигде не указывает на то, какие критерии были ею приняты при выборе моделей вторичной структуры.

Раздел 3.4 (также отсутствует в автореферате) посвящен обсуждению полиморфных сайтов в ITS1 и ITS2 и попытке интерпретировать их как свидетельство гибридного происхождения их носителей. С доводами автора по большей части можно согласиться, однако без клонирования и повторного секвенирования клонированных последовательностей окончательных выводов здесь сделать, на мой взгляд, не получится.

Раздел 3.5 (в автореферате включен в состав раздела 3.1) посвящен измерению r -дистанций между видами *Elymus*, а также некоторыми представителями *Elytrigia* и *Agropyron*.

Раздел 3.6, состоящий в диссертации из трех подразделов, более или менее соответствующих разделам 3.2, 3.4 и 3.5 автореферата, посвящен описанию и обсуждению филогенетических деревьев, построенных диссертантом. Раздел состоит из трех частей, в первой из которых анализируются и обсуждаются деревья, построенные по данным ядерных ITS. Деревья построены методами NJ и Байеса и с их обсуждением диссертантом можно вполне согласиться. К сожалению, из-за низкого разрешения деревьев отношения исследуемых групп выявляются только

частично. Не вполне понятно, почему Ксения Сергеевна решила представить полученные деревья в виде кладограмм, а не филограмм, выбросив, таким образом, информацию, связанную с длинами ветвей. Эта информация часто бывает очень полезной, особенно, при сравнении близких видов. То, что диссертанту не удалось показать никакого соответствия между традиционным подразделением рода *Elymus* на секции и полученными деревьями ITS совершенно не удивительно для аллополиплоидной группы, анализируемой по ядерным маркерам. Построенные деревья показывают родство между молекулами, а не между таксонами. Поэтому вполне естественно, что последовательности, секвенированные из разных представителей одного вида могли попасть в разные клады.

Вторая часть этого раздела посвящена обсуждению деревьев, построенных теми же методами по данным хлоропластного участка *trnL-trnF*. Изменчивость данного участка оказалась недостаточной, по причине чего разрешение в пределах исследуемой группы практически отсутствует. Поэтому рассуждения автора в этой части о том, что «виды рода имеют несколько разных предков по материнской линии» (стр. 99) в данном случае нельзя считать обоснованными. На последующих страницах приводятся две таблицы №№ 22 и 23 с указанием полиморфных позиций выравнивания *trnL-trnF* и только «парсимонично-значимых позиций». Каким образом была определена их парсимоническая значимость, в тексте диссертации нигде не комментируется. Вместе с тем, судя по достаточно большому числу замен и, в особенности, инделей, возникает вопрос, как диссертант могла получить деревья с таким плохим разрешением? Вероятно, это может быть связано с тем, что при построении деревьев информация об инделях не использовалась, а, с другой стороны, в анализ были включены образцы с плохо прочитавшимися последовательностями, которые могли внести значительный информационный «шум» в матрицу.

Третья и последняя часть раздела озаглавлена, как «Изменчивость ITS последовательностей группы видов *E. dahuricus* aggr. и происхождение St-субгеномов у этих видов» и содержит, пожалуй, наиболее интересные результаты проведенного исследования. Здесь Ксения Сергеевна анализирует состав риботипов в роде *Elymus* и, в особенности, в группе близкородственных видов, объединяемых

под названием *E. dahuricus* s.l. Выделяемые ею два риботипа, обозначенные как Northern dahuricus St-DNA и Southern dahuricus St-DNA имеют различное географическое распространение и, вероятно, эволюционировали параллельно в разных линиях одних и тех же видов. Автором обсуждается их возможное происхождение и интерпретируется их встречаемость у одних и тех же видов. Не вполне понятными, однако, остаются принципы, на основании которых эти (а также и другие риботипы, характерные для иных групп видов *Elymus*) риботипы были выделены. Во всяком случае, судя из таблицы 24 и приведенной на рисунке 22 сети NeighborNet в пределах каждого риботипа наблюдается весьма значительная изменчивость, так что, фактически, каждый из них представляет собой не риботип, а целую эволюционную линию. К сожалению, автор в своей работе не исследовала вопрос о возможности рекомбинации между последовательностями ITS и не построила генеалогической сети риботипов, чтобы исследовать их возможные связи более эксплицитным образом, используя алгоритмы статистической парсимонии или медианных сетей.

В целом, выводы диссертации сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам и их обсуждению в тексте диссертации.

Полученные Ксенией Сергеевной результаты работы достаточно апробированы на ряде всероссийских и международных конференций. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций. Проведенное исследование выполнено на высоком научном уровне и вполне соответствует критериям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика и 03.02.01. – ботаника.

В заключение следует сказать, что, несмотря на целый ряд критических замечаний, высказанных в данном отзыве, работа в целом производит достаточно благоприятное впечатление. Насколько можно судить из текста диссертации, автором проделана большая работа по получению и многостороннему анализу последовательностей двух участков ядерной и хлоропластной ДНК у азиатских представителей рода *Elymus*. Автореферат соответствует содержанию диссертации,

несмотря на некоторые отличия в нумерации разделов третьей главы. По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная диссертация соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Ксения Сергеевна Добрякова, достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07. – «Генетика» и 03.02.01. – «Ботаника».

Отзыв представил:

Шанцер Иван Алексеевич  _____,

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией молекулярной систематики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Адрес: Москва 127276, Ботаническая ул., д. 4

Телефон: 8(499)977-8033

e-mail: ischanzer@gmail.com

Дата: 29 мая 2018 г.

Подпись Шанцера И.А. заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
ГЛАВНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА им. Н.В. ЦИЦИНА
Российской академии наук Шелешова О.В.



