"Утверждаю"

[redacted]

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН)
д.б.н. Д.В. Гельтман

05 октября 2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

- Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН на диссертацию Артура Юрьевича Никулина на тему « **ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ *OROSTACHYS SPINOSA* (L.) SWEET (CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК**», представляемую к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07-ГЕНЕТИКА.

Представляемая к защите диссертация А.Ю. Никулина изложена на 120 страницах формата А4, иллюстрирована 18 рисунками и содержит 13 таблиц. Структура диссертации традиционна:– состоит из Введения, Обзора литературы, описания методов и объектов исследования, глав Результаты и Обсуждение, Заключения, Выводов, Списка литературы.

Актуальность предпринятого исследования.

Во Введении автор обосновывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи работы. По мнению диссертанта, актуальность исследования обусловлена несколькими обстоятельствами:

Система рода *Orostachys* Fisch. (Горноколосник, сем. Толстянковые) до сих пор остается предметом дискуссий (разные исследователи относят к роду от 10 до 22 видов), так как морфологические признаки, используемые при решении проблем систематики, высоко полиморфны. В частности, неясно положение в системе рода основного объекта исследований - вида Горноколосник колючий (*O. spinosa*). Предпринятая ранее попытка

использовать для систематики рода кладистический анализ морфологических признаков не позволила сделать сколько-нибудь определенных выводов (Бялт, 1999).

Методы геносистематики в работе с Crassulaceae, и, в частности, с кругом родства рода *Orostachys,* почти не применялись (редкие исключения: Mayuzumi, Ohva, 2004; Гончарова, 2006, Гончарова и др., 2008; Kozyrenko et al., 2013). Исследование генетической структуры популяций и геногеографии видов рода никогда не проводилось.

Многие виды рода *Orostachys* обладают ценными лекарственными свойствами Экстракты из многих видов толстянковых широко применяются в народной медицине. Их исследование методами метаболомики – популярное направление в современной фитохимии.

Наконец, представители семейства Толстянковых, в том числе объекты настоящего исследования, являются популярными декоративными растениями

С нашей точки зрения, автор диссертации совершенно резонно сформулировал цель и задачи исследования:

Объявленной целью исследования является выявление филогенетических связей видов круга родства *Orostachys spinosa,* изучение генетического разнообразия и популяционной структуры *O. spinosa* путем сравнительного исследования нуклеотидных последовательностей района внутренних транскрибируемых спейсеров генов 35S рРНК генома ядра и нескольких межгенных районов генома хлоропластов.

Задачи исследования были следующими:

1. Секвенировать нуклеотидные последовательности ITS-района генов 35S рРНК *O. spinosa* и близких ему видов подсекции *Appendiculatae* (*O. chanetii* (H. Léveillé) A. Berger, *O. japonica* (Maxim.) A. Berger, *O. thyrsiflora* Fisch.), обработать результаты методами молекулярной филогенетики (геносистематики), произвести моделирование вторичных структур транскриптов ITS1 и ITS2.

2. Уточнить родственные связи *O. spinosa* в трибе Telephieae по результатам сравнения ITS-региона рДНК и методом «молекулярной датировки» («молекулярных-часов») определить время диверсификации основных линий трибы.

3. Осуществить поиск информативных на популяционном уровне маркеров в хлоропластном геноме, секвенировать их нуклеотидные последовательности и дать оценку генетического разнообразия и популяционной структуры *O. spinosa.*

4. Провести анализ генеалогических связей между гаплотипами и реконструировать возможные пути расширения ареала *O. spinosa.*

Видно, что задачи исследования вполне соответствуют заявленной цели исследования. Разумность и обоснованность поставленной задачи и целей исследования и актуальность предпринятого диссертантом цикла работ не вызывают у нас никаких сомнений.

Анализ текста диссертации.

Глава «Обзор литературы» логична по подбору материала, показывает хорошую теоретическую подготовку диссертанта как генетика растений и вводит читателя в проблематику работы. Этот раздел диссертации компактен, занимает всего 22 страницы текста. В первом параграфе этой главы диссертант кратко касается актуальных проблем систематики и филогении семейства Толстянковые. Это одно из проблемных семейств, результаты молекулярно-филогенетического исследования которого плохо согласуются со сложившимися «морфологов» представлениями о системе семейства. Так, согласно широко принятой ботаниками системе сем. Crassulaceae A Berger'a (1930), в основу которой были положены в качестве основных такие систематические признаки, как степень сростнолепестности и число кругов андроцея в цветках, в семействе было выделено 6 филогенетических линий в ранге подсемейств. Результаты геноситематики (сравнительного исследования ITS и нескольких хлоропластны маркеров) показывают, что пять из 6 подсемейств системы Бергера полифилетичны.

В следующем параграфе диссертантом рассмотрена информация о видах семейства, которые использовались и используются в народной и в доказательной медицине как обладающие лекарственными свойствами. В частности, приведен ряд исследований, в которых отмечалось адаптогенное действие экстракта *O. spinosa* и говорится о перспективности использования этого вида как продуцента лекарственных факторов.

Третий и четвертый параграфы Обзора литературы посвящены обсуждению системы рода Orostachys и виду Orostachys spinosa (L.) Sweet. Диссертант отмечает, что основные исследования были проведены им на видах типовой секции Orostachys, в составе которой он признает *O. boehmeri* (Makino) H. Hara, *O. malacophylla* (Pall.) Fisch., *O. maximowiczii* Byalt, *O.paradoxa* Czerep. а в подсекции *Appendiculatae, кроме O. spinosa* изучались *O. chanetii* (H. Léveillé) A. Berger, *O. japonica* (Maxim.) A. Berger, *O. thyrsiflora* Fisch.

Возможно, в этом разделе следовало бы указать, что специально проведенное В. Бялтом исследование типовых образцов показало, что *O. chanetii* это синоним *O. ramosissima* (Maxim.) Byalt (Бялт, 1999, стр. 129).

Параграфы 5-7 содержат описанию и краткому обсуждению основных молекулярных маркеров (участков генома ядра и хлоропластов), используемых в молекулярно-филогенетических исследованиях и исследованиях в области геногеографии. Эти разделы, как и Обзор литературы в целом, показывают, что диссертант уверенно владеет современной информацией об объекте исследования и о методах, которые он использовал в своей работе.

Раздел «Материал и методы» написан ясно и достаточно подробно. В нем описано происхождение 261 растения из 47 популяций 6 видов, ядерная и хлоропластная ДНК которых была секвенирована и изучена в данной работе. Надо подчеркнуть, что Диссертантом исследован необычно большой материал, представляющий разные участки ареала O. spinosa (28 популяций, 211 растений) и O. japonica (14 популяций, 45 образцов), что в молекулярно-филогенетических исследованиях встречается, к сожалению, редко, между тем, это может быть важным при работе со столь сложной в таксономическом отношении группой.

Далее достаточно подробно описаны методы работы с ДНК и методические подходы, которые использовались для анализа секвенированных последовательностей. В целом, раздел «Материалы и методы» показывает высокую профессиональную подготовку диссертанта как современного генетика, владеющего не только методами работы в поле при сборе образцов для исследования, но и как специалиста, владеющего методами геномики.

Однако мы вынуждены отметить одну неточность в описании методов работы. Диссертант пишет: Молекулярная датировка возникновения основных линий Telephieae проведена в рамках байесовского подхода в пакете программ BEAST 1.8.1 (Drummond et al., 2012). При этом «были использованы значения скорости нуклеотидных замен, рассчитанные Жанг с соавт. (Zhang et al., 2014) и варьирующие от $3{,}46 \times 10^{-9}$ до 8.89×10^{-9} замен на сайт в год».

Источник этих важных данных, лежащих в основе расчетов времени дивергенции таксонов, остается для читателя неизвестным, так как в списке литературы есть только одна работа Жанга 2014 года: Zhang et al. Phylogenetic Relationships and Character Evolution of Rhodiola (Crassulaceae) based on Nuclear Ribosomal ITS and Plastid trnL-F and psbA-trnH Sequences // Systematic Botany (2014), 39(2): pp. 441–451 где никаких расчетов скорости нуклеотидных замен нет, нет и ссылок на подобные расчеты.

Вероятно, имелась ввиду другая работа этого же автора: Zhang J-Q, Meng S-Y, Rao G-Y (2014) Phylogeography of *Rhodiola kirilowii* (Crassulaceae): A Story of Miocene Divergence and Quaternary Expansion. PLoS ONE 9(11): e112923. doi:10.1371/journal.pone.0112923/ где собственных расчетов тоже нет, но есть фраза, от которой, по-видимому, и отталкивался диссертант в своих расчетах: «The substitution rate of nrITS in shrubs and herbs varies from 3.46 $x10^{-9}$ to 8.69 x 10^{-9} s s yr [67]. Considering the uncertainty of the rates, we used a normal distribution prior to cover these ranges with a 95% confidence interval, which is a mean of 6.075 x 10^{-9}, and SD of 1.59 x 10^{-9}». Видим уже знакомые нам цифры.

Авторы цитируемой статьи указали, что взяли эти цифры из статьи Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD, Hollingsworth PM. 2001. Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees// *Science* **293:** 2242–2245. что тоже не соответствует действительности. У Ричардсона (SCIENCE VOL 293 21 SEPTEMBER 2001, стр. 2245) приведены скорости накопления нуклеотидных замен в ITS для травянистых растений в интервалах от 1.72 x 10^{-9} до 9.0 x 10^{-9}

У нас нет оснований думать, что отмеченное темное место в методике расчетов могло существенно сказаться на результатах проведенных диссертантом хронологических оценок, поскольку мы (и автор диссертации) можем отталкиваться от данных о скорости нуклеотидных замен в ITS2 Crassulaceae, рассчитанных Ричардсоном и соавт. (цит. соч.) на основании результатов работы Mes THM., van Brederode J, 't Hart H 1996. Origin of the woody Macaronesian Sempervivoideae and the phylogenetic position of the East African species of *Aeonium*// Bot. Acta 109:477–491. – там скорость накопления замен 5.69 x 10^{-9} – т.е. почти неотличимо от уровня, взятого за основу диссертантом.

Обратимся теперь к главам «Результаты» и «Обсуждение». Несомненно, это лучшая часть работы. Глубокое впечатление на читателя производит объем проведенной работы. Диссертантом амплифицированы и секвенированы 84 нуклеотидные последовательности района ITS1–5.8S рДНК–ITS2 и 685 (!) последовательностей некодирующих регионов хпДНК, из них по 207 последовательностей районов *trnH–psbA*, *trnQ–rps16* и *rpl32–trnL*, и, кроме того, 24 последовательности района *trnD–trnT* и 40 последовательностей спейсера *trnS–trnG*. Все нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank EMBL/NCBI. В тех случаях, когда диссертант подозревал наличие внутригеномных вариантов, различающихся делециями или вставками, последовательности после амплификации клонировались, и амплифицировались варианты из нескольких клонов. Для того, чтобы провести однозначное выравнивание района ITS диссертант построил и проанализировал модели вторичной структуры транскриптов ITS.

С помощью методов геносистематики, на основе анализа последовательностей ITS были построены филогенетические деревья (филогенетические гипотезы), установлены филогенетические связи между основными эволюционными линиями трибы Telephieae. Впервые показано близкое родство между видом (монотипным родом) *Meterostachys sikokiana* (Makino) Nakai и видами рода *Orostachys,* относимым к подсекции *Appendiculatae.*

Тем самым подтвердилась обоснованность мнения Ohwi (1953) и Kim (1974), которые помещали этот вид в род *Orostachys,* основываясь на общем для них признаке - хрящеватых придатках с остроконечиями на листьях прикорневых розеток, не смотря на то, что по многим иным морфологическим признакам (зонтиковидные, а не колосовидные как у горноколосников, соцветия, сидячие карпели с очень короткими столбиками, а не на ножках с длинными столбиками, как у горноколосников и т.д.), этот вид отличается от *Orostachys*.

Диссертантом впервые обнаружен внутригеномный полиморфизм в ITS1 у культивируемых садовых экземпляров вида *O. japonica.*

Особенно интересен раздел работы, посвященный филогеографии *O. spinosa*. В результате секвенирования очень большого числа образцов, диссертантом разработана система риботипов и хлоротипов, раскрывающая генетическое разнообразие этого интересного во многих отношениях вида флоры России. Отметим, что диссертантом не только строились деревья и сети, но и оценивались параметры генетического разнообразия, был проведён AMOVA. Т.е. в диссертации соблюден баланс между "кладистическими" и "популяционными" методами анализа. Интересно, что удалось показать наличие двух групп родства (двух дивергентных групп хлоротипов), разделенных длинной ветвью сети в 11 мутационных шагов. Графики, построенные для популяций из Западной группы, в основном, имеют мультимодальный характер, что предполагает длительную популяционную стабильность. Распределение парных генетических различий в популяциях Восточной группы свидетельствует о быстром росте популяций в недавнем прошлом. На основании полученных данных диссертантом с высокой долей вероятности определен центр происхождения *O. spinosa,* разработана красивая концепция его появления на Алтае и в Восточной Сибири, на Урале, в Якутии и Магадане.

В дополнение к вышесказанному, в этом разделе, как нам представляется, следовало бы обсудить очевидную гетерогенность рода *Orostachys,* две секции которого занимают совершенно различные положения на филогенетическом древе. Было бы интересно прочитать, что думает диссертант о происхождении горноколосников Шантарских островов с их уникальными риботипами.

Объем выполненной работы, разнообразие методов, современность статистической обработки данных, убедительные графики и схемы – все выполнено на очень высоком современном уровне.

Теоретическая и практическая значимость проведенного исследования не вызывает никаких сомнений. Полученные диссертантом данные заметно дополняют имеющиеся представления о филогенетических отношениях родов и видов в семействе Crassulaceae в целом, и в трибе Telephieae подсемейства Sempervivoideae, в частности. Впервые появились данные о генетическом разнообразии, популяционной структуре и филогеографии *O. spinosa* – одного из самых широко распространенных и интересных видов семейства. Результаты этой работы могут быть использованы при чтении курсов лекций для студентов, специализирующихся на кафедрах ботаники, генетики и биотехнологии.

В работе отработаны, опробованы несколько экспериментальных подходов, которые могут быть полезны для мониторинга состояния природных популяций цветковых растений с целью сохранения их генетического разнообразия, для проведения фармакологических исследований вида и для развития биотехнологических разработок на основе растительного сырья.

На основе детального исследования риботипов и хлоротипов, определенных и описанных в данной работе могут быть разработаны эффективные ДНК-штрихкоды, полезные при определении качества лекарственного сырья в фармакогнозии.

Текст диссертации написан хорошим языком, ясно и просто. В работе много интересных, по-настоящему новых, иногда неожиданных результатов и выводов. Это яркий пример исследования, выполненного высококвалифицированным генетиком в области геносистематики и геногеографии растений.

Результаты представляемого к защите исследования А.Ю. Никулина «ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ *OROSTACHYS SPINOSA* (L.) SWEET (CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК» опубликованы в нескольких авторитетных рецензируемых журналах и неоднократно обсуждались на представительных отечественных и международных конференциях. Положения, выносимые на защиту и определяющие выводы из работы, обоснованы полученным материалом и представляются достоверными.

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

Актуальность и новизна предпринятого А.Ю. Никулиным исследования, его соответствие планам фундаментальных исследований и основных направлений в российской

науке, корректность выводов и положений, выносимых на защиту не вызывает никаких сомнений. Результаты этой работы уже сейчас известны специалистам генетикам и ботаникам и, несомненно, будут востребованы в будущем. Результаты этого исследования обязательно будут учтены в новых редакциях и дополнениях к региональным Красным книгам, использованы при чтении лекций по генетике, ботанике, и систематике и филогении цветковых растений в университетах страны.

Диссертация Артура Юрьевича Никулина, представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07-Генетика действительно является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития генетики как науки, в ней впервые предложено научно обоснованное решение важной проблемы, связанной с исследованием геногеографии и геносистематики флоры России.

Диссертация обладает внутренним единством и содержит новые, обоснованные личными наблюдениями и расчетами научные результаты и положения, свидетельствующие о личном вкладе автора, А.Ю. Никулина в науку. Тем самым, представленная к защите кандидатская диссертация А.Ю. Никулина «ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ И ФИЛОГЕОГРАФИЯ *OROSTACHYS SPINOSA* (L.) SWEET (CRASSULACEAE J.ST.-HIL.) ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ МЕЖГЕННЫХ СПЕЙСЕРОВ ЯДЕРНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК», соответствует критериям, установленным в пунктах 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук.

Диссертант заслуживает присуждения ему ученой степени кандидат биологических наук по специальности 03.02.07–Генетика.

Подпись руки Родионова А.В., Носова Н.Н.
ЗАВЕРЯЮ
ОТ [redacted]
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

Доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биосистематики и цитологии БИН РАН,
профессор [redacted] Александр Викентьевич Родионов

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного семинара лаб. биосистематики и цитологии БИН РАН 5 октября 2017 г.

Секретарь семинара, кандидат биологических наук,
научный сотрудник [redacted] Николай Николаевич Носов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН)

197376, г. Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, дом 2, тел./факс +7 (812) 372-54-43

Avrodionov@binran.ru