

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Лютовой Людмилы Владимировны на тему:

«ТАКСОНОМИЯ И ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА ДРОЖЖЕЙ KLUYVEROMYCES LACTIS»

по специальностям 1.5.18. Микология, 1.5.7. Генетика

Людмила Владимировна своё исследование посвятила изучению молекулярного полиморфизма, таксономии и эволюции дрожжей *Kluyveromyces lactis*. Дрожжи, а особенно биотехнологически значимые виды из родов *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*, *Lipomyces* и др., как и патогены из родов *Candida* и *Cryptococcus*, являются постоянным объектом исследований микологов и генетиков. Объект исследования Людмилы Владимировны – вид *Kluyveromyces lactis* – расположен на третьей строчке в списке наиболее биотехнологически значимых дрожжей (Johnson, Echavarri-Erasun, 2011), однако в генбанке NCBI имеются записи только о 7 геномах этого вида, для сравнения, у *Saccharomyces cerevisiae* – 1618. Это указывает на недостаточное внимание к этому биотехнологически значимому виду. Исследование вида *Kluyveromyces lactis* также очень актуально и для таксономии дрожжей. В настоящее время внутривидовые таксономические единицы «разновидность» или «подвид» практически не используется в систематике дрожжей. Проведенный недавно анализ данных показал, что в период 2001–2019 были описаны около 1200 дрожжей, но этот список включал только 8 разновидностей и 1 подвид (Voekhout et al., 2022). Раньше использование таких ранговых единиц в таксономии было обычной практикой, но к настоящему времени их большинство было перенесено в синонимы. Вместе с тем, известно, что многие виды дрожжей являются гетерогенными по генетике, в том числе по рибосомальным генам, и по физиологии. Исследование внутривидовой дифференциации вида

Kluyveromyces lactis, анализ его разновидностей и популяций может дать определенные ориентиры для дифференциации других «больших» и очень переменных видов дрожжей. Также стоит отметить, что дрожжи *Kluyveromyces lactis* – это прекрасный объект для исследования эффекта Клювера. Изучение локуса *LAC* и его эволюции имеет большое значение и для биотехнологии и для биологии этих дрожжей. Таким образом, цель выполненной работы является достаточно актуальной и представляет большой интерес для фундаментальной и прикладной науки.

Для реализации поставленной цели Людмила Владимировна освоила и успешно использовала классические и некоторые современные микробиологические, генетические и молекулярные методы. Были исследованы 107 коллекционных штаммов дрожжей рода *Kluyveromyces*, выделенных из молочных продуктов и природных источников в разных регионах мира. Была подтверждена правомерность выделения сбрасывающих лактозу штаммов в отдельную разновидность *K. lactis* var. *lactis*, а также неоднородность разновидности *K. lactis* var. *drosophilorum*, которая включает 6 генетически изолированных популяций. Было показано, что ген *ACT1* может быть рекомендован для достоверной дифференциации внутривидовых популяций дрожжей вида *K. lactis*. Выполненный анализ β -галактозидаз и пермеаз видов *Kluyveromyces* указал на общее происхождение локусов *LAC* дрожжей разновидности *K. lactis* var. *lactis* и молочных штаммов *K. marxianus*. Полученные результаты исследования были опубликованы в 11 печатных работах, из них четыре статьи в журналах, рецензируемых в Scopus и Web of Science, а также были представлены на международных и всероссийских конференциях.

Диссертационная работа Лютовой Л.В. состоит из 153 страниц и включает 7 разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Работа содержит 35 рисунков, 10 таблиц. Список литературы включает 197 источников. Обзор литературы дает полную картину систематики дрожжей

рода *Kluyveromyces*, а также приводится рассмотрение генов *LAC* ферментации лактозы и прикладного значения фермента β-галактозидазы. Методическая часть работы, результаты и их обсуждение изложены достаточно подробно с позиции использованных методов и подходов к исследованию. Положения, выносимые на защиту, и сделанные выводы подкреплены полученными результатами.

В целом диссертация выполнена на хорошем уровне и является классической работой по исследованию генетики и биологии дрожжей.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Однако к работе есть несколько вопросов, требующих прояснения, и замечания:

В настоящее время исследования генетики, в том числе, популяционной генетики и физиологических возможностей ряда вида дрожжей производится с использованием данных по полным геномам. Не проще ли было при выполнении некоторых исследований *Kluyveromyces lactis* сделать анализ полных геномов для представителей исследованных разновидностей и популяций?

Стр. 14. В обзоре Barnett (1992) нет данных об обнаружении Шванном в 1939 году аскоспор, а даётся традиционная ссылка – Max Reess (1870).

Стр. 34. Фразу «Помимо дрожжей *Kluyveromyces*, этим свойством (сбраживание лактозы) обладают только некоторые виды *Candida*, *Debaryomyces* и *Scheffersomyces*.» следовало бы дополнить ещё несколькими родами, представители которых сбраживают лактозу: *Groenewaldozyma*, *Torulasporea*, *Trichomonascus*.

Часто встречается неправильное написание (как *Kluyveromyces nonfermentans*) вида *Kluyveromyces nonfermentans*.

Стр. 50. Субстрат «Морская грязь» следовало бы обозначить как в первоисточнике – морской седимент или же осадок.

Стр. 51. В списке литературы нет ссылки на Durham, 1898.

Стр. 59. Нет пояснения, зачем нужно было использовать праймеры собственного дизайна для гена *EF-1α*.

Табл. 6. Нет данных о положении праймеров собственного дизайна.

Стр. 72. Штамм NRRL Y-1140 отсеквенирован, информация про 6 хромосом указана в NCBI. При обсуждении полученных кариотипов следовало бы добавить и эти данные.

Раздел 4.2.2. Нет данных по размеру отсеквенированных фрагментов исследованных генов и нет ссылок на номера генбанка для полученных сиквенсов, что является стандартной практикой любых генетических исследований. Из-за этого возникает вопрос к исследованному фрагменту гена *EF-1α* – на рис. 15 последний вариабельный нуклеотид идет под номером 661, а было ли прочтение дальше? Например, при использовании стандартных праймеров EF-983 и EF-2218 размер амплифицированного региона получается более 1200 п.н.

Рис. 17. Нет статистической поддержки сходства-родства между исследованными популяциями, бутстрэп подтверждает только группировку исследованных штаммов по популяциям.

Почему в работе не были рассмотрены другие ДНК-маркеры, используемые для систематики дрожжей: RPB1, RPB2, COX II и mitochondrial SSU?

Вместе с тем, указанные замечания и возникшие вопросы не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.18. Микология и 1.5.7. Генетика, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на

соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лютова Людмила Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.18. Микология и 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:

к.б.н., в.н.с. лаборатории почвенной микробиологии

кафедры биологии почв факультета почвоведения

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Качалкин Алексей Владимирович

03.05.2024

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.03 микробиология (биологические науки)

03.02.08 экология (биологические науки)

Адрес места работы:

119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12,

факультет почвоведения МГУ, кафедра биологии почв.

Тел.: _____; e-mail: _____

Подпись сотрудника

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени

М.В. Ломоносова» факультет почвоведения, каф. биологии почв

А.В. Качалкина удостоверяю:

Ученый секретарь факультета почвоведения МГУ

Ю.А. Микулина