

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Боровковой Алены Николаевны
на тему: «Молекулярно-генетическое разнообразие культурных и
природных дрожжей рода *Saccharomyces*»
по специальностям 1.5.18 – Микология; 1.5.7 – Генетика**

Дрожжи-сахаромицеты – первый микроорганизм, одомашненный человеком, он широко используется в производстве при приготовлении хлеба, вина, пива и производстве спирта. Одновременно дрожжи-сахаромицеты являются популярным объектом экспериментальных исследований в теоретической генетике и исключительно хорошо изучены генетически. В процессах хлебопечения, пивоварения, виноделия и производства спирта ключевые роли играют определенные ферменты, которые улучшают качество продуктов и эффективность производства. Для винных дрожжей очень важна способность расщеплять высокомолекулярные пектиновые вещества растительного происхождения, этот сложный процесс идет с участием нескольких ферментов, основным из которых является пектиназа. Способность ферментировать мальтозу и изомальтозу очень важна для пекарских, пивных и спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*. Род *Saccharomyces* включает еще семь видов: *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*. Дрожжи *S. bayanus* используются в виноделии и пивоварении, в то же время их таксономическое положение до сих пор остается спорным. Наряду с *Saccharomyces cerevisiae*, продуцентами некоторых важнейших ферментов являются штаммы других видов *Saccharomyces*. Изучение генетической детерминации синтеза этих ферментов, идентификация у представителей разных видов *Saccharomyces* генов, отвечающих за синтез ферментов, создает теоретическую платформу для переноса этих генов в производственные штаммы дрожжей с целью улучшения их качества и продуктивности. В связи

с вышеизложенным тема представленной диссертационной работы является **актуальной.**

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа Боровковой А.Н. изложена на 214 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы из трех глав, главу «материалы и методы», четыре главы результатов. Отдельные разделы – заключение, выводы, список цитированной литературы, который включает 282 источника. Диссертация содержит 4 таблицы и 36 рисунков, в основном это филогенетические деревья. Материал диссертационной работы хорошо структурирован и иллюстрирован, изложен последовательно, логично.

Во **Введении** дано обоснование актуальности выбранной темы исследования и приводится краткая характеристика степени изученности рассматриваемых вопросов. Отмечается неисследованность пектиназных генов дрожжей *Saccharomyces* и недостаточность данных в научной литературе и международных генетических базах об эволюции α -глюкозидаз и происхождении α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей *Saccharomyces*.

Сформулирована **цель** исследования, которая раскрыта в шести задачах, описана новизна и методология исследования. На защиту вынесены четыре положения, обоснованность которых базируется на анализе полученных автором экспериментальных результатов и их сравнении с имеющимися в литературе данными по изучаемой проблеме.

Обзор литературы состоит из трех глав. В **главе 1** дано описание истории систематики дрожжей-сахаромицетов и методов дифференциации видов; дана характеристика видов по молекулярным признакам, принципам филогенетического анализа, видовой дифференциации.

Глава 2 посвящена субтеломерным генам ферментации сахаров, а **глава 3** – конкретным субтеломерным пектиназным генам *PGU*, контролирующим расщепление пектина.

В **главе 4 «Материалы и методы»** детально описаны молекулярные методы исследований и метод классического гибридологического анализа.

Экспериментальная часть представлена главами 5-8 и Заключением.

ГЛАВА 5. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*: БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВИД *S. JUREI*.

Проведен ПДРФ-анализ 5.8S-ITS фрагментов с использованием эндонуклеаз *HpaII* и *HaeIII*. Были идентифицированы штаммы вида *S. paradoxus*, новый для России вид *S. jurei*, который впервые был кариотипирован. Также установлено, что один штамм является гибридом дрожжей *S. cerevisiae* и *S. paradoxus*. Для определения генетического родства видов рода *Saccharomyces* проведен мультигенный филогенетический анализ на ограниченном материале штаммов с привлечением типовых культур всех 8 видов. При сравнении нуклеотидных последовательностей β-фруктозидазных генов *SUC2* дрожжей *S. jurei* и остальных видов *Saccharomyces* наибольший уровень сходства отмечен с геном *SUCm S. mikatae* (94.6%).

ГЛАВА 6. ВНУТРИВИДОВОЙ ПОЛИМОРФИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВИДА *SACCHAROMYCES BAYANUS*.

На материале 45 штаммов *S. bayanus* изучен внутривидовой полиморфизм с использованием ПДРФ-анализа амплифицированных IGS2-фрагментов рДНК, секвенирования ITS1-участка, а также трех ядерных (*FSY1*, *HIS3*, *MET2*) и двух митохондриальных (*FUN14*, *COX2*) генов. В результате филогенетического мультилокусного анализа было выделено пять кластеров по генетическому сходству штаммов. Гибридологическим анализом выявлена пониженная выживаемость аскоспор гибридов между штаммами из различных кластеров, при этом наблюдалась регулярная мейотическая сегрегация контрольных ауксотрофных маркеров. На основании полученных данных автором сделан вывод о том, что комплексный вид *S. bayanus* представлен несколькими таксономическими разновидностями.

ГЛАВА 7. α -ГЛЮКОЗИДАЗЫ MAL И IMA ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*.

Для установления происхождения α -глюкозидаз IMA и MAL дрожжей-сахаромицетов проведен поиск гомологичных последовательностей α -глюкозидаз (мальтаз и изомальтаз) у 8 видов *Saccharomyces* и дрожжей родов *Kluveromyces* и *Lachancea* в базе данных GenBank. На основании полученных данных построено филогенетическое древо родства аминокислотных последовательностей α -глюкозидаз MAL и IMA. Диссертант выполнила филогенетический анализ множественных α -глюкозидаз, который показал, что изомальтазы IMA и мальтазы MAL образовались у общего предка дрожжей родов *Saccharomyces*, *Lachancea* и *Kluveromyces*. Установлено, что дивергентная изомальтаза IMA5 появилась в геноме дрожжей-сахаромицетов уже после их расхождения с дрожжами *Lachancea* и *Kluveromyces*.

Глава 8. ПРИРОДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПЕКТИНАЗНЫХ ГЕНОВ *PGU* ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES*.

541 штамм дрожжей были оценены на пектинолитическую активность, из них 306 штаммов *S. cerevisiae*. Причем, 230 штаммов *S. cerevisiae* не имели активности на среде, а секвенирование амплифицированных у них генов *PGU1* выявило наличие стоп-кодонов. Остальные представители 7 видов сахаромицетов, в той или иной степени, обладали пектинолитической активностью. У изученных штаммов *Saccharomyces* впервые была определена хромосомная локализация генов *PGU* и проведен сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *PGU*.

В разделе «**Заключение**» на 9 страницах кратко изложены результаты диссертации. Этот раздел несколько перегружен ссылками на литературные данные, часть материала можно было поместить в раздел обзора литературы.

Диссертационная работа **Боровковой Алены Николаевны** «Молекулярно-генетическое разнообразие культурных и природных дрожжей рода *Saccharomyces*», представленная на соискание научной

степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.18. – Микология, и 1.5.7. – Генетика, является завершенной научно-исследовательской работой в области таксономии и частной генетики дрожжей-сахаромицетов. Диссертационная работа выполнена на хорошем методическом уровне с использованием комплекса методов и современных биоинформационных программ. Все эксперименты проводились в повторности и их достоверность не вызывает сомнения. Автором получены новые данные в области таксономии дрожжей-сахаромицетов: показано, что вид *S. jurei* филогенетически близок к виду *S. mikatae*, а виды *S. bayanus* и *S. arboricola* – наиболее дивергентные виды рода *Saccharomyces*. К достижениям диссертанта можно отнести результаты кариотипирования восьми биологических видов рода *Saccharomyces*, а именно: обнаружение реципрокных транслокаций у *S. jurei* и *S. mikatae*. На примере вида *S. bayanus* изучена внутривидовая изменчивость. Диссертант оценила выживаемость гибридных аскоспор между представителями пяти генетических популяций комплексного вида *S. bayanus* и с помощью молекулярных методов показала значительную генетическую дивергенцию западнокитайских и новозеландских штаммов этого вида. **Впервые** проведен масштабный скрининг пектинолитической активности у всех восьми видов рода *Saccharomyces* и показано, что способность секретировать активную эндополигалактуроназу является видоспецифичным признаком видов *S. bayanus* и *S. paradoxus*.

Практическим результатом данной работы можно считать создание коллекции штаммов дрожжей видов *S. cerevisiae*, *S. bayanus* *S. paradoxus*, которую можно использовать как для фундаментальных исследований, так и для селекции новых культур винных дрожжей с улучшенными качествами за счет усиления пектинолитической активности.

Выводы, сделанные Боровковой А.Н., обоснованы и достоверны, полностью отражают полученные ею результаты и соответствуют целям и задачам диссертационной работы.

Все представленные в диссертационной работе результаты опубликованы в шести статьях в журналах из списка ВАК, а также обсуждены на международных и всероссийских конференциях. **Тема диссертации, публикации по работе и положения, выносимые на защиту**, обоснованы представленным экспериментальным материалом, продуманы и корректно сформулированы и полностью соответствуют специальностям 1.5.18. – Микология и 1.5.7. – Генетика.

Автореферат изложен на 22 страницах, хорошо оформлен и полностью соответствует содержанию самой диссертации. Выводы в автореферате и диссертации идентичны.

Принципиальных замечаний к диссертации не имеется, однако хочу отметить ряд **вопросов и замечаний**, возникших по ходу прочтения текста диссертации:

1) Почему в качестве объекта и предмета исследования автор называет «штаммы дрожжей *Saccharomyces* различного экологического и географического происхождения», а не коллекцию штаммов 8 видов рода *Saccharomyces*?

2) В конце литературного обзора хотелось бы увидеть в заключении, какую систему классификации видов рода принял автор для своей работы.

3) Раздел «Объекты исследования»: все 575 штаммов восьми биологических видов *Saccharomyces* приведены в 5 таблицах Приложения. Остается непонятным, какие штаммы автор считает культурными, а какие природными?

4) Глава 5. Непонятно, зачем проводили реидентификацию 13 коллекционных штаммов *Saccharomyces*?

5) Глава 6. Если *S. bayanus var. bayanus*, *S. bayanus var. uvarum*, *S. eubayanus* можно отнести к таксономическим разновидностям, то какой статус придается двум популяциям – западнокитайской и новозеландской?

Указанные в отзыве замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Боровковой А.Н. отвечает

требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.18. – Микология (по биологическим наукам); 1.5.7. – Генетика (по биологическим наукам), 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 Боровкова Алена Николаевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.18. – Микология; 1.5.7. – Генетика.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
Ведущий научный сотрудник лаборатории иммунитета растений к болезням
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Мироненко Нина Васильевна

Контактные данные, адрес организации:

Тел.: _____, e-mail: _____
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»,
1966608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д. 3,
лаборатория иммунитета растений к болезням,
Тел.: _____; e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.00.24 – Микология, 03.00.15 – Генетика