

О Т З Ы В

официального оппонента о диссертационной работе ДОМБЛИДЕС Артура Сергеевича на тему «Интеграция методов молекулярно-генетического маркирования с селекционным процессом овощных культур», представленной на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности: 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

В основе методологической базы адаптивной интенсификации растениеводства и овощеводства в частности, лежит системный подход, базирующийся на вовлечении в интенсификационный селекционный процесс качественно новых факторов и методических подходов, а также увеличении их интегративного эффекта. Необходимость системного подхода при рассмотрении проблем сельскохозяйственного производства и селекции вытекает из известного положения о том, что именно здесь «требуется в первую очередь, чем где бы то ни было, изображение процесса в целом, учет всех тенденций и определение их равнодействующей или их суммы, их результата» (цит. по А.А.Жученко, 1990). Практическая реализация этой задачи осуществляется за счет использования значительно возросших благодаря современным достижениям науки возможностей повышения как эффективности селекционных процессов в целом, так и составляющих их компонентов, в частности за счет привлечения и использования методов молекулярно-генетического маркирования для ускорения и упрощения селекционного процесса. Все это позволяет признать тему диссертационной работы А.С. Домблидеса актуальной, а все научные положения, выносимые на защиту, обоснованными.

Диссертационная работа изложена на 349 страницах машинописного текста, и построена по традиционному плану. Она состоит из введения, главы посвященной обзору литературы, главы, содержащей условия, материал и методы исследований, главы, описывающей результаты исследований, а также главы с основными результатами, заключения, списка использованной литературы и приложения.

Во Введении диссертант дает обоснование актуальности и научной новизны темы исследований по созданию надежных, простых в использовании, экономичных маркеров для генетических и селекционных исследований, в том числе и у овощных, к которым относятся высоко значимые культуры, широко распространенные в мире. Автор справедливо отмечает, что разработка и применение генетических технологий для изучения и оценки биоразнообразия культурных и диких форм растений во многом определяет основные направления селекционной работы на улучшения хозяйственно ценных качеств. Практическая важность изучения этих проблем не вызывает сомнения, а обоснованный упор в диссертации на исследования овощных культур является одной из сильных сторон диссертации.

В первой главе, посвященной обзору литературных данных, диссертант дает развернутую характеристику изучению растительных геномов, типам мутаций, вызывающие генетическую изменчивость и методам ее выявления. Описываются разнообразные молекулярно-генетические методы и разработанные на их основе генетические ДНК-маркеры. Это очень удачная глава, занимающая по своему объему примерно 1/3 часть всего машинописного текста диссертации. В ней А.С Домблидес довольно подробно и системно рассматривает вопросы разработки и использования методов ДНК-анализа и перспективы развития систем ДНК-маркирования. В этой же главе диссертант приводит цель и задачи исследований, научную новизну и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Заканчивается эта глава «связью исследований с тематическим планом научно-исследовательских работ» и «апробацией работы». Несмотря на то, что первая глава написана хорошо и читается с большим интересом хотелось бы задать диссертанту вопрос об обмене одним нуклеотидом ДНК, который также может происходить и происходит при рекомбинации: Что это – рекомбинация или все же мутация?.. К сожалению автор обошел этот крайне важный вопрос хотя вопросы инделов и обмен небольшими участками ДНК рассмотрел, а ранее в этой же главе рассматривал однонуклеотидные трансверсии и транзиции. Логично было бы рассмотреть и однонуклеотидную рекомбинацию и дать ей оценку как рекомбинационному или как мутационному процессу. Этого сделано не было.

Глава вторая посвящена использованным в работе материалам и методам. Небольшая по объему глава является очень важной. В ней автор излагает современные методы, с помощью которых им были решены поставленные задачи. Эта глава написана хорошо, не вызывает возражений и показывает высокий методический уровень проведенных исследований.

Третья глава посвящена результатам исследования. Это очень интересная глава, в которой автор шаг за шагом показывает, как были проведены эксперименты, и какие при этом были получены результаты. Читается эта глава с большим интересом и ясно показывает, что автору удалось достичь поставленной перед собой цели: разработать системы ДНК-маркирования, адаптировать существующие подходы генетического анализа, реализуя применение этих методов для усовершенствования селекционного процесса и ускоренного получения новых форм овощных культур. На протяжении двухсот страниц диссертант шаг за шагом проводит читателя через все этапы, предлагаемые им системы методов ДНК-маркирования овощных культур, подробно описывая и обсуждая полученные им результаты экспериментов.

Третья глава посвящена результатам исследования. Это очень интересная глава, в которой автор шаг за шагом показывает, как были проведены эксперименты, и какие при этом были получены результаты. Читается эта глава с большим интересом и ясно показывает, что автору удалось достичь поставленной перед собой цели: разработать системы ДНК-маркирования, адаптировать существующие подходы генетического анализа, реализуя применение этих методов для усовершенствования селекционного процесса и ускоренного получения новых форм овощных культур.

Именно выбор различных овощных культур и различных молекулярно-генетических маркеров для анализа и маркирования геномов исследуемых образцов позволил получить новые фундаментальные данные о структурном полиморфизме и хромосомной локализации геномных последовательностей, позволяющих идентифицировать и выявлять полиморфизм на геномном уровне, что придает дополнительную общебиологическую значимость проведенным исследованиям. Так, например, было показана возможность определения генетического разнообразия капустных культур на основе ДНК маркирования. Используя различные источники — RAPD и микросателлитные маркеры, а также уникальные последовательности генов восстановителей фертильности и участвующих в синтезе витамина С у капустных культур, диссертант показал эффективность использованных им классической, мультиплексной и ОТ-ПЦР для идентификации полиморфизма на молекулярно-генетическом уровне.

Были также проведены аналогичные анализы и оценка генетической изменчивости у селекционных генотипов моркови, сельдерея, петрушки, луковых культур, чеснока озимого и фасоли обыкновенной. На наш взгляд нет необходимости подробно описывать и обсуждать качественный и хорошо представленный научный материал. Мы позволим себе задать несколько вопросов, которые, как нам представляется будут уместны в связи обсуждаемым материалом диссертации А.С. Домлидеса. В третьей главе диссертант использует статистические подходы для оценки меры информационного полиморфизма (PIC) и гетерозиготности (H). Поддерживая эти подходы, тем не менее не очень понятно, почему диссертант ограничился только ими не определил такие сопутствующие величины как эффективное мультиплексное отношение (effective multiplex ratio, EMR), которое определяют как продукт общего числа локусов на праймер и фракцию (долю) полиморфных локусов и маркерный индекс (marker index, MI), который является статистической величиной, используемой для расчета суммарной пригодности маркерной системы. На наш взгляд, использование этих статистических параметров позволило бы определить правильность использованных диссертантом маркерных подходов и не только укрепило бы полученные А.С. Домлидес результаты, но и подтвердило бы эффективность избранных

им маркерных систем. Ведь известно, что чем выше значение MI , тем лучше используемая методика. В то же время, для того чтобы отразить способность взаимоотношения праймер/используемая методика устанавливать различия между большим числом генотипов, используют показатель разрешающей способности (Resolving power, R_p), что также не было определено диссертантом.

Кроме того, диссертант в своей работе говорит об определенной эффективности маркерного отбора перед фенотипическим. Так, например, на стр. 100 диссертант говорит: «Применение молекулярного анализа позволит более точно определить генетические различия между группами, выделяющимися в составе сортовой популяции ...». Не ставя под сомнение этот тезис, мы, тем не менее, хотели бы обратить внимание, на эффективность комбинированного отбора, основанном как на фенотипическом, так и маркерном, в том числе молекулярно-маркерном, отборе.

При проведении молекулярно-маркерного отбора необходимо помнить, что его эффективность может упасть очень быстро из-за фиксации желаемых аллелей количественных признаков и рекомбинации между локусами хромосом, определяющих их, и маркерами. В этом случае, существует вероятность переоценки взаимоотношения между маркерами и улучшенным и/или исследуемым признаком и, как результат, исследователь может ошибочно продолжить отбор только по маркерам. При одновременном отборе как по фенотипу, так и по маркерам задействуются все источники изменчивости и, вследствие этого, окончательный результат будет намного лучше. При таком подходе маркеры необходимо рассматривать как ассоциированные признаки: их генетическая корреляция с основным признаком прямо пропорциональна квадратному корню процента изменчивости, объясняемой с помощью маркеров. Как указывают Lande R., Thompson B. (*Genetics*. 1990. 124: 743-756) при фиксированном весе (мере) фенотипической (или генотипической) изменчивости, объясняемой маркерами, приданном фенотипическому значению, он увеличивается с наследуемостью признака, в то время как вес (мера), данный маркерам ослабевает.

Если наследуемость высока, то вклад молекулярных маркеров мал. Если наследуемость получается слишком низкой, относительно того какой она должна быть для данного числа генотипированных растений, то число ошибок в определении генов и/или локусов хромосом, определяющих изучаемый признак (фальшивых позитивов, низкая точность при определении эффектов таких генов/локусов хромосом) будет возрастать. В таком случае маркеры ничего не вкладывают в отбор и даже могут приводить к ошибкам. Очевидно, что эффективность молекулярных маркеров тем выше, чем больше процент генетической изменчивости, объясняемой с помощью маркеров. Обычно это результат

Nh^2r_G , который необходимо принимать во внимание, при этом N — это размер популяции, а h^2 — наследуемость в узком смысле этого слова, r_G — часть фенотипической (или генотипической) изменчивости, объясняемой маркерами (Lande R., Thompson B., *Genetics*. 1990. 124: 743-756). Из этого следует, что область действенности маркерной помощи комбинированному отбору соответствует очень низкой наследуемости (между 0,10 и 0,30), очень высокой плотности маркеров и достаточно большому размеру популяции (Gallais A., Charcosset A., *Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers. Proc. 9th Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding. Van Oijen J.W., Jansen J. (eds.)*. 1994. p. 91-99).

Проблема, которая появляется с маркерным типом отбора — затраты в финансовом плане, поскольку переоценки взаимоотношения маркер-признак требуются при проведении каждого селекционного цикла. Если совместить маркерную селекцию и отбор по фенотипу, сравнив в их оптимуме по одним и тем же вложениям, то комбинированная маркерная помощь отбору, как представляется, имеет небольшие преимущества (Moreau L., Lemarie S., Charcosset A., Gallais A. *Crop Sci*. 2000. 40: 329-337). Эффективное решение, включая материальные вложения в гено-типирование и проведение эксперимента, может заключать в себе перемежающееся комбинирование «фенотип + маркерная селекция» с отбором только по маркерам (Gallais A., Dillmann C., Hospital F., *Proc. 10th Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding. Krajewski P., Kaczmarek Z. (eds.)*. IGR, Poznan, 1997. p. 111-116; Hospital F., Moreau L., Lacoudre F., Charcosset A., Gallais A., *Theor. Appl. Genet*. 1997. 95: 1181-1189). Причем отбор только по маркерам можно сделать для двух или трех циклов с целью получения так называемых, «форсированных» поколений, поскольку такой подход не требует полевой оценки.

Преимущества комбинированного отбора «фенотип + маркер» заключается в том, что он использует все источники изменчивости. Скрещивания между комплементарными растениями могут быть рассмотрены для увеличения вероятности трансгрессии с целью сохранения изменчивости немаркированных генов и/или локусов хромосом. Однако при наличии достаточного большого числа маркированных генов и/или локусов хромосом управление системой становится более трудным и более затратным в финансовом плане, нежели случайное перекрестное скрещивание отселектированных растений. К сожалению, диссертант ничего не говорит об этом при проведении им запланированных экспериментов. А это, как представляется нам, является одним из краеугольных камней при выборе селекционером того или иного метода при проведении селекционного отбора.

Для комбинированной маркерной помощи отбору важным преимуществом является то, что маркеры позволяют устанавливать генотипическое значение, которое равно степени

увеличения наследования. Действительно, генетическое значение является более точно предсказуемым за счет использования маркеров, ассоциированных с необходимыми локусами хромосом, поскольку каждая особь, несущая маркер аллеля количественного признака является своеобразной репликой такого нужного аллеля. Чем больше особей содержат данный аллель количественного признака, тем больше точность отбора. Таким образом, оценка по маркерам может быть заменена настоящими репликами особей, с хорошо известными средними значениями для увеличения наследуемости. Оба способа увеличения наследуемости должны быть в арсенале любого селекционера. Селекционер должен иметь возможность выбора между тем, чтобы делать большее число репродукций без использования маркеров, с одной стороны, и использованием маркеров, что позволяет существенно уменьшить число репродукций, с другой стороны. Таким образом, проблема из биологической по существу становится чисто экономической.

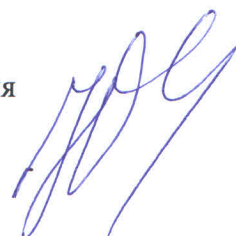
Если вернуться к маркерной помощи отбору, предлагаемой и использованной в своей работе диссертантом то, как представляется, применение молекулярных маркеров может сократить время селекционного процесса в межсезонный период, и, прежде всего, за счет отсутствия необходимости проведения полевой оценки. Более того, диссертант прав, говоря о том, что маркеры просто незаменимы для управления процессом рекомбинации для того, чтобы аккумулировать желаемые аллели в одном генотипе так быстро насколько это возможно. Но для того, чтобы использовать достоинства и преимущества молекулярных маркеров полностью необходимо разработать новые схемы, например, рекуррентной селекции или создания, например, рекуррентных генотипов. Или говоря другими словами, при проведении молекулярно-маркерных исследований и отборов не стоит забывать о классической селекции и ее преимуществах.

Несмотря на высказанные выше ремарки, которые скорее следует рассматривать не как замечания, а как предложения продолжения начатой диссертантом работы, следует отметить, что автором проделана большая и плодотворная работа, практическим результатом которой явились сорт сельдерея черешкового и листового Атлант и сорт петрушки Нежность. Все вынесенные на защиту положения, судя по диссертации и автореферату, можно признать достоверными. Новизна исследований и полученных результатов, на наш взгляд, не вызывает сомнения. Заключение и выводы, представленные в диссертации, вполне соответствуют полученным результатам и, безусловно, имеют немалое значение для науки и практики. Кроме того, автор дает практические рекомендации, применение которых в селекционном процессе овощных культур, по нашему мнению, будет способствовать не только ускорению этого процесса, но и способствовать управлению генетической изменчивостью, включая ее практическое

использование. По теме диссертации автором опубликовано 40 печатных работ, в том числе 8 работ, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, и 8 работ в изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Немногочисленные опечатки, на которых мы не сочли нужным останавливаться при рассмотрении диссертации А.С Домблидес, нисколько не снижают ценность работы и квалификации автора.

Исходя из вышеизложенного считаю диссертацию Домблидес Артура Сергеевича соответствующей уровню научно-исследовательских работ, представленных на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук, а также требованиям оформления диссертаций ВАК, принятых в Российской Федерации. Автор диссертации А.С. Домблидес, несомненно, заслуживает присуждения степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Чесноков Юрий Валентинович, доктор биологических наук,
директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Агрофизический научно-исследовательский институт» (ФГБНУ АФИ)
Гражданский проспект, д.14, 195220 г. Санкт-Петербург, Россия
тел. (812) 534-13-24; e-mail: yuv_chesnokov@agrophys.ru



Подпись Ю.В. Чеснокова заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ АФИ



И.В. Тарасенкова
01.03.2022