

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, академика РАН, научного руководителя Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» Харченко Петра Николаевича на диссертацию Домблидеса Артура Сергеевича «Интеграция методов молекулярно-генетического маркирования с селекционным процессом овощных культур», представленную на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 - селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

Актуальность темы исследований

Накопленный в последнее время объём знаний в области молекулярной биологии растений значительно расширил возможности использования молекулярно-генетических методов не только в области фундаментальных научных направлений, но и положило начало большому разнообразию доступных технологий и подходов для непосредственного внедрения их в практическую селекцию растений. Интенсивное применение таких методов позволяет получать новые научные данные в области филогении, биологии роста и развития, особенностей наследования признаков, расшифровке геномов, технологии молекулярного клонирования или генной инженерии растений.

Все исследования в области генетических технологий, включая методы молекулярно-генетического маркирования, определяются рамками указа Президента Российской Федерации от 28.11.2018 г. № 680 «О развитии генетических технологий в Российской Федерации», в том числе в области сельского хозяйства. Одно из важных направлений – развитие высокопроизводительных методов генетического анализа способствовало генерации массива данных о геномах ряда основных овощных культур, таких как томат, огурец, капуста и другие, что уже помогает планированию селекционного процесса на основе знаний о генетических особенностях исходных рабочих коллекций используе-

мого селекционного материала. В сущности, такие методы позволяют напрямую использовать генетические технологии в селекции, что называется «в поле», идентифицируя гены хозяйственно ценных признаков, определяя генетическую идентичность, однородность и отличимость образцов, выявляя при этом более высокий уровень генетической изменчивости. Использование современных методов позволяет теперь решать разнообразные задачи в растениеводстве. Как известно, развитие молекулярных технологий в практической селекции растений идёт по направлению от методов фрагментного анализа до техник анализа высокой точности и производительности. С появлением информации о расшифрованных нуклеотидных последовательностях функциональных генов у ряда культур появились возможности по использованию широко распространённых экспрессирующихся EST-SSR-маркеров, которые также характеризуются локусами с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP). Необходимо отметить, что молекулярные маркеры, в настоящее время уже приняты в качестве рекомендованного метода определения происхождения сортов культурных растений рабочей группой UPOV (Международный союз по охране новых сортов растений).

Тем не менее, несмотря на уже значительные результаты в этом направлении, ещё предстоит провести достаточное количество фундаментальных и прикладных исследований с целью глубокого генотипирования, идентификации и характеристики генов, отвечающих за проявление многих хозяйственно ценных признаков. Несомненно, разработка и совершенствование методов выявления генетического полиморфизма растений есть важнейшая задача для улучшения качества, продуктивности, устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды получаемых сортов и гибридов овощных культур, что непосредственно ведёт к улучшению качества питания человека.

Диссертационная работа Домблidesа А.С. посвящена проблемам практического использования ДНК-маркеров с целью их широкого внедрения в селекционный процесс овощных культур. Обоснована необходимость генетической оценки исходного селекционного материала перед включением в селекционный

процесс, и последующей оценке качества полученных новых форм. По причине того, что методы молекулярно-генетической оценки становятся неотъемлемой частью современных селекционных программ овощных культур, то работа, показывающая процесс интеграции этих методов с селекцией, представляется сейчас крайне актуальной.

Научная новизна проведённых исследований

Проведена глубокая генетическая оценка ранее неизученного селекционного материала капустных культур методами RAPD и SSR- маркирования. Выявлена сортовая генетическая изменчивость, определены генетические положения селекционных линий, а также недавно созданных гибридов F₁. Выделены уникальные генотипы, подтверждено происхождение и установлена генетическая идентичность ценных отечественных сортов капусты кочанной, которые были районированы более 80-ти лет назад. Разработана система маркеров для эффективной идентификации всех основных типов стерильности цитоплазмы капустных культур. В ходе расшифровки и выравнивания последовательностей *orf138*, отвечающего за проявление мужской стерильности *Ogura* обнаружен новый неописанный ранее аллельный вариант этого гена. Расшифрованы транскрибируемые участки генов, участвующих в синтезе аскорбиновой кислоты у этих же культур. Была изучена вариабельность и разработаны праймеры для оценки активности генов, отвечающих за качественные свойства, такие как содержание витамина С и каротина у капустных культур и моркови. С помощью ПЦР в реальном времени показана возможность выявления генотипов – источников с повышенной активностью соответствующих генов среди образцов моркови столовой и капусты огородной для селекции на качество. На основе оптимизации набора ISSR-маркеров была проведена идентификация ценных для селекции форм межвидовых гибридов и видов лука. Впервые проведено генетическое изучение значительного числа (54 генотипа) неизученных ранее селекционных образцов чеснока на основе изучения полиморфизма 17-ти микросателлитных локусов.

Практическая значимость проведённых исследований

Полученные результаты помимо исследовательской ценности имеют высокую практическую значимость для последовательного развития современной селекции овощных культур. Подобраны условия для проведения генетических исследований на основе ПЦР и определён оптимальный набор эффективных праймеров для овощных культур. Получены результаты о генетической основе используемых селекционных образцов капустных культур, представителей семейства Сельдерейные, представителей рода *Allium*, установлены степени их схожести и различия, определены генетические дистанции среди селекционных линии, сортов, разновидностей, гибридов F₁, что позволяет планировать селекционный процесс. На основе данных молекулярного анализа доказана отличимость популяций созданных сортов сельдерея и петрушки (Атлант и Нежность) от исходных популяций. С использованием ДНК-маркеров проведена идентификация селекционных образцов, несущих факторы стерильности у капустных культур, моркови, лука репчатого, что значительно упрощает и сокращает время для поиска ценного линейного материала для селекции на гетерозис. Разработанные ДНК-маркеры для определения уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе витамина С, применены для поиска генисточников с высоким уровнем синтеза аскорбиновой кислоты. Проведена идентификация генов устойчивости у фасоли обыкновенной к вирусу обыкновенной мозаики и подтверждено, что сочетание двух разных генов в доминантном и рецессивном состоянии определяет устойчивость генотипов фасоли к вирусу обыкновенной мозаики. Выделены и рекомендованы генотипы, несущие генетическую устойчивость.

Степень достоверности полученных научных результатов подтверждена реализацией программы научных исследований в период с 2003 по 2020 годы, согласно плану научно-исследовательских работ ФГБНУ ФНЦО. Для достижения поставленной цели проведено большое число ПЦР-экспериментов с использованием различных протоколов ДНК-маркирования. Согласно описа-

нию, приведённому в главе «Материалы и методы исследований», условия проведения и приборная база для молекулярных экспериментов соответствует всем предъявляемым для этого требованиям. Статистическая обработка результатов была проведена методами многомерной статистики с использованием различных специализированных общепринятых статистических пакетов программ: Genstat 6, GenAlEx 6.5, Darwin 6, STRUCTURE 2.3.6. и другие. Значимые результаты диссертационной работы представлены в форме устных и постерных докладов на 26-ти Российских и Международных научных мероприятиях, и опубликованы в 41-ой печатной работе, из которых восемь входят в международную базу данных Scopus и Web of Science.

Структура диссертации

Диссертация и автореферат оформлены согласно требованиям ГОСТ Р 7.0.11-2011. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, куда входят описание использованного растительного материала, методов исследования, результатов исследований, заключения по результатам, библиографического списка использованной литературы и приложение. Общий объем диссертации составляет 349 страниц печатного компьютерного текста, включая 37 таблиц и 119 рисунков. Библиографический список литературы составляет 614 источников, из которых 587 на иностранных языках. Автореферат полностью отражает структуру и содержание диссертационной работы.

Оценка содержания диссертации, степени достижения поставленной цели исследований

Во введении обосновывается актуальность изучаемой темы, представлены основные тенденции развития и использования молекулярно-генетических методов. В завершении раздела определена актуальность, поставлены цель и задачи исследования, приводится научная новизна и практическая значимость проведённых исследований.

Обзор литературы сосредоточен на анализе различных методов молекулярного маркирования с оценкой возможностей применения, описанием фактов использования в конкретных селекционных программах, преимущественно овощных культур. Анализ литературных источников логично подводит к проблеме дальнейшего интенсивного изучения генетической основы овощных культур для повышения эффективности селекционного процесса. Отмечен большой временной диапазон источников, входящих в цитируемый список литературы от 1908 до 2020 гг. Экспериментальная часть включает главу «Материалы и методы исследований», посвящённой подробному описанию растительных объектов исследования, включающий значительное число образцов селекции ФГБНУ ФНЦО, коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова. В разделе также приведены протоколы экспериментов, указаны методы статистической обработки данных с использованием различных статистических методов. Глава «Результаты исследований» состоит из четырёх больших разделов. Большой объем экспериментальных данных, представленный в разделе 3.1, получен по капустным культурам, включая выявление генетического полиморфизма среди селекционных образцов, изучение структуры популяций, выявления и изучения генов, отвечающих за проявление мужской стерильности и генов восстановления фертильности, разработка маркеров для генов, участвующих в синтезе витамина С. В разделе 3.2 приводятся данные по изучению генетического полиморфизма сортов, селекционных линий моркови, сельдерея и петрушки. Созданы сорта на основе данных молекулярно-генетического анализа. Автором также проведены исследования по моркови, где выявлен и идентифицирован фактор мужской стерильности типа «*петалоид*», и изучена экспрессия генов, участвующих в синтезе каротиноидов, содержание которых является определяющим при оценке на качество этой культуры. Раздел 3.3 посвящён изучению селекционных образцов рода *Allium*, с помощью молекулярных маркеров проведена классификация и идентификация хозяйственно важных видов и форм межвидовых гибридов. Экспериментально показано и обосновано автором необходимость использования ДНК-маркеров для поиска стерильных линий и линий за-

крепителей стерильности у лука репчатого для создания гибридов F_1 . Получены результаты по SSR-маркированию 16-ти сортов лука репчатого и 54-х образцов чеснока. В разделе 3.4 приведены данные и обсуждение результатов идентификации генов устойчивости у селекционных образцов фасоли, что позволило выявить ценные генисточники устойчивости к вирусу обыкновенной мозаики.

В завершении в разделе «Основные результаты» приведено краткое описание всех полученных важных моментов диссертационной работы. Заключение включает 15 значимых выводов по результатам, которые подтверждают достижение запланированной цели и решения поставленных задач. Практические рекомендации ясно обосновывают и определяют важность использования техник молекулярно-генетического маркирования. Таким образом, в итоге проделанной работы была проведена оптимизация, разработка и адаптация методов молекулярно-генетического маркирования, использование которых становится необходимым условием при успешной реализации селекционных программ овощных культур.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные экспериментальные данные и научная обоснованность выводов в заключении подтверждает, что для эффективной реализации селекционной программы с наименьшими трудозатратами необходимо внедрять методы молекулярно-генетического исследования на всех этапах селекционного процесса: от начальной оценки исходного селекционного материала до идентификации полученных форм, определения качества отбора, оценки выравненности, гомозиготности селекционных и биотехнологических линий, «чистоты» гибридных форм, контроля наличия генов устойчивости, факторов мужской стерильности при гибридизации. Результаты генетической классификации становятся важной основой для планирования и реализации селекционной работы по изученным овощным культурам.

Общая оценка проделанной исследовательской работы в целом

Соискателем проделана большая работа, имеющая научную новизну, теоретическую и практическую значимость. Развитие и совершенствование методов молекулярно-генетического маркирования будет только наращиваться со временем, и приобретать первостепенное значение при выработке стратегии создания улучшенных форм у различных видов сельскохозяйственных растений. Сейчас уже трудно представить современную селекционную программу без применения генетических технологий, практически на всех этапах реализации задач современной селекции растений. Многоплановость проведённых исследований объясняется действительно крайней востребованностью использования ДНК-маркеров для большого спектра селекционных задач.

Значительных замечаний снижающих качество проделанной научной работы не имеется. В тексте есть опечатки, на которые нет необходимости указывать. Из технических вопросов можно отметить то, что в главе «Материалы и методы исследований» протоколы экспериментов можно было бы изложить несколько компактнее, не описывая детально моменты, связанные с оптимизацией ПЦР и проведением электрофоретического разделения продуктов ПЦР.

Кроме того, было бы интересно действительно представить данные по содержанию аскорбиновой кислоты у конкретно изученных генотипов капустных культур и сравнить с уровнем экспрессии соответствующих генов.

В качестве пожелания хотелось бы предложить более подробное изучение новых полученных расшифрованных последовательностей генов, связанных с синтезом аскорбиновой кислоты, например анализ на наличие замен, делеций, повторов и т.д., как это было сделано при изучении генов стерильности у капустных культур.

Заключение о соответствии диссертационной работы критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней

Диссертация «Интеграция методов молекулярно-генетического маркирования с селекционным процессом овощных культур», представленная на соис-

вание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений является многогранным завершённым научным исследованием, в котором показано и реализовано внедрение методов молекулярно-генетического маркирования в практическую селекцию овощных культур.

По актуальности, научной новизне, практической значимости и объёму выполненных исследований диссертационная работа отвечает требованиям п. 9-14, предъявляемым к докторским диссертациям, утверждённых ВАК Российской Федерации (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года «О порядке присуждения учёных степеней», с изменениями от 11.09.2021), а её автор, Домблидес Артур Сергеевич, заслуживает присуждения учёной степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Официальный оппонент:

Харченко Петр Николаевич
доктор биологических наук (научная специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений), профессор, академик РАН, Научный руководитель ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»

Адрес: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»:

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

Тел.: +7 (499) 976 -65-44. Факс: +7 (499) 977 -09 -47.

E-mail: iab@iab.ac.ru

Подпись

Харченко Петр Николаевич

Заверено

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ

Е.М. Федина

«2» марта 2022 г.



2 марта 2022 г.