

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора, Калашниковой Елены Анатольевны 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 исследования. Разработка отечественных биотехнологий и методов маркер вспомогательной селекции, а также внедрение их в практическую селекцию необходимо, как для реализации программы импортозамещения в РФ, так и для выведения сельскохозяйственного семеноводческого рынка Российской Федерации на мировой уровень за счёт разработки биотехнологических методов ускорения селекционного процесса. Биотехнология сельскохозяйственных растений, включая целый комплекс методов, позволяет получить генетически однородный материал, сохранить ценные генотипы, создать новые селекционные формы. Изучение генетической variability геномов, паспортизацию, идентификацию генов и определение их уровня экспрессии, секвенирование проводят с использованием последних знаний и методов, созданных на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), где процесс происходит в искусственных условиях *in vitro*.

ПЦР-технологии постоянно совершенствуются, увеличивается их точность и производительность, что позволяет эффективнее их использовать на различных этапах селекционного процесса.

Рациональное использование и сохранения генетических ресурсов культурных растений невозможно без использования методов оценки генетической основы используемых селекционных образцов, и без знаний об источниках хозяйственно ценных признаков. Современные методы генетического анализа позволяют решить многие задачи в селекционном процессе без длительной, и зачастую трудоёмкой фенотипической полевой оценки, где многие морфологиче-

ские признаки могут изменяться под воздействием внешних факторов и условий выращивания. Только ДНК-маркеры позволяют достаточно точно определить генетическую родословную всех изучаемых культурных растений, в том числе и новых форм, получаемых с использованием культуры тканей и органов *in vitro*. Разработано несколько десятков типов маркеров, включающие мультилокусные и монолокусные техники анализа, которые применяют для решения многих частных и общих задач селекции растений. Использование, например, SSR-маркеров (Simple Sequence Repeats) для оценки происхождения и степени гомозиготности включено в постоянные протоколы по получению линий удвоенных гаплоидов (DH-растений) методами культуры изолированных микроспор, пыльников и семяпочек *in vitro* у огурца, дыни, перца, капустных культур.

Биотехнология сельскохозяйственных растений как набор большого числа методов не только позволяет получать прогнозируемый результат, но значительно сокращает затраты на поиск, размножение и выведение ценных форм. ДНК-маркеры выступают важной основой в оценке и контроле всех этапов современного селекционного процесса, что теперь определяется как маркеропосредованная селекция и геномная селекция. Активное вовлечение различных молекулярно-генетических методов в традиционный селекционный процесс позволяет увеличить эффективность отбора ценных генотипов и поиска образцов, несущих хозяйственно ценные признаки. Биотехнология, как и молекулярное маркирование, становятся единым мощным инструментом в ускоренной реализации разнообразных селекционных программ у овощных культур. Перспективность проведения исследований в этом направлении не вызывает сомнений. Таким образом, выбранная тема диссертационной работы актуальна, а результаты исследований в этом направлении востребованы как для получения новых фундаментальных знаний, так и для практического использования в селекции.

Оценка новизны и практической значимости исследований. Результаты проведённых исследований обладают несомненной научной новизной. Следует отметить большой объем взятых для исследования образцов овощных

культур, где большое внимание уделяется наиболее востребованным капустным, луковым культурам и моркови. Проведено маркирование различными методами нескольких десятков селекционно ценных генотипов. В итоге получены новые знания по генетической родословной неизученных до этого сортов, видов, разновидностей, гибридов F₁, межвидовых гибридов селекционных и биотехнологических линий, проведено маркирование ценных генотипов и выделены генисточники у капустных культур, представителей семейства *Apiaceae* и рода *Allium*. Впервые адаптирован метод мультиплексной ПЦР, позволяющий определять сразу пять типов цитоплазмы *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *Nap*, *Pol*, *Cam* для поиска генотипов, несущих факторы мужской стерильности у различных представителей капустных культур. Изучение расшифрованных последовательностей гена *orf138*, определяющего стерильность *Ogura* позволило выявить неизвестный ранее аллельный вариант у капусты белокочанной, который был депонирован в международную базу данных NCBI. Кроме этого, были секвенированы кодирующие участки последовательностей генов, кодирующих ферменты синтеза аскорбиновой кислоты ГДФ-L-галактозофосфорилазу (*VTC2*), L-галактозо-1-фосфат фосфатазу (*VTC4*) и L-галактозодегидрогеназу образцов вида *B. oleracea* L. Разработаны праймеры для оценки уровня активности изученных генов с помощью ПЦР в реальном времени, и с их помощью и проведено сканирование селекционных образцов. На основе ISSR-ПЦР анализа был разработан универсальный метод для подтверждения гибридного происхождения ценных межвидовых гибридов и форм среди представителей рода *Allium*. Показана высокая вариабельность микросателлитных локусов у неизученных ранее 54 селекционных образцов чеснока.

В практической значимости проведённых исследований необходимо отметить, прежде всего, разработку экономичных методов ДНК-маркирования селекционных образцов овощных культур. Подобраны наборы эффективных праймеров для разных методов маркирования при генетической идентификации большого числа разнообразных селекционных образцов. Разработаны маркеры для ПЦР в реальном времени, позволяющие идентифицировать генисточники

повышенного синтеза аскорбиновой кислоты и каротина у капустных культур и моркови. Данные молекулярного анализа показали эффективность отбора популяций у зеленных культур при создании двух сортов Атлант и Нежность. На основе оценки селекционных образцов лука репчатого, был оптимизирован набор маркеров, позволяющий выявлять генотипы с мужской стерильностью, генотипы закрепители стерильности и генотипы, восстанавливающие фертильность, которые необходимы для создания гибридов F₁. Также важным практическим результатом для ведения дальнейшей селекционной работы следует считать идентификацию образцов фасоли обыкновенной, несущих генетическую устойчивость к вирусу обыкновенной мозаики на основе адаптированного ПЦР-анализа, подкреплённого фенотипической оценкой.

Степень достоверности научных исследований, выводов рекомендаций. Все этапы диссертационной работы проводили в рамках плана научных исследований ФГБНУ ФНЦО, где проводилась их ежегодная экспертная оценка. Исследования осуществлялись в сотрудничестве с селекционно-семеноводческими лабораториями ФГБНУ ФНЦО, а изученный селекционный растительный материал используется в действующих селекционных программах. Достоверность полученных результатов также подтверждается подробно описанными протоколами экспериментов, проведённых согласно опубликованным требованиям к молекулярно-генетическим исследованиям. Полученные данные статистически обработаны в программах, применяемых для обработки данных молекулярного анализа. Результаты и обсуждения опубликованы в высокорейтинговых журналах как отечественных, так и международных изданий. Восемь статей представлены в базах, входящих в Web of Science и Scopus. Большой объем диссертационной работы представлен на 26-ти профильных Российских и Международных конференциях и симпозиумах. Получены патенты на два сорта зеленных культур, которые используются в производстве. Выводы отражают основные научные достижения, которые были реализованы в рамках поставленных задач. Рекомендации сформулированы на основании по-

лученных результатов, и конкретных примеров использования молекулярных маркеров в селекционном процессе.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа имеет значительный объем в 349 страниц компьютерного текста, включая приложение. Список литературы содержит 614 источников, в том числе 587 на иностранных языках. В тексте диссертации содержится 119 рисунков и 37 таблиц.

Введение даёт краткое описание преимуществ использования молекулярных маркеров в современной селекции растений. Аналитический обзор литературы затрагивает проблемы применения методов и технологий ДНК-маркирования с конкретными примерами их использования в селекции овощных культур. Приведены основные направления селекционной работы, где ДНК-маркеры оказываются необходимыми для достижения поставленных целей. В заключении обзора литературы автор делает акцент на том, что, несмотря на интенсивное развитие таких технологий, многие вопросы остаются неизученными, и значительная информация о генетической вариабельности селекционных образцов, наличия генов, отвечающих за важные хозяйственно ценные признаки, пока не доступна для всего объёма используемого селекционного материала овощных культур. В итоге, определена актуальность, поставлены цель и задачи перед исследованием.

Раздел 2 «Экспериментальная часть» начинается с описания использованных в работе растительных объектов, принадлежащих семейству Капустные, семейству Сельдереиные, роду *Allium*, семейству Бобовые. В методической части приводятся методы выделения нуклеиновых кислот из растений, экспериментальные протоколы проведения и оптимизации молекулярного маркирования на основе ПЦР-анализа, методы электрофоретического разделения ДНК-фрагментов, методы расшифровки фрагментов ДНК, математическая обработка полученных данных.

Раздел 3 «Результаты исследований» имеет четыре подраздела. Большое внимание уделяется капустным культурам, где проведено изучение генетической родословной ценных селекционных образцов особенно у капусты белоко-

чанной, структуры популяции сорта Амагер 611, генетических факторов мужской стерильности, структуры генов, участвующих в синтезе аскорбиновой кислоты. Во втором подразделе 3.2 объединены представители семейства Сельдевые. Получены данные молекулярного анализа сортов и разновидностей петрушки и сельдерея, установлены филогенетические взаимосвязи между неизученными селекционными образцами. У моркови, как важнейшего в хозяйственном отношении представителя семейства, проведено изучение генетической изменчивости сортов и селекционных линий, факторов мужской стерильности, экспрессии генов, участвующих в синтезе каротиноидов.

Большой объем исследований проведён с селекционными образцами рода *Allium*. Изучено 16 сортов лука репчатого с использованием SSR-маркеров, идентифицированы межвидовые гибридные формы, факторы стерильности цитоплазмы, гены восстановления фертильности. Получены данные генетического анализа 115-ти SSR-аллелей у 54 – селекционных образцов чеснока. В подразделе 3.4 дана информация по выявлению генотипов несущих устойчивость к вирусу обыкновенной мозаики среди селекционных образцов фасоли с применением ПЦР-анализа. Выводы в заключении отражают основные научные достижения работы. Практические рекомендации обосновывают важность использования методов молекулярно-генетического маркирования в селекционных программах овощных культур. Содержание автореферата и публикаций автора полностью соответствуют полученным результатам, представленным в диссертационной работе.

Замечания и пожелания по диссертационной работе

Несмотря на явные достоинства диссертационной работы необходимо указать на некоторые замечания и высказать пожелания:

- 1 – не целесообразно разделять задачи на более частные вопросы;
- 2 – в главе «экспериментальная часть» в разделе «Материал и методы исследований» желательно объекты исследований сгруппировать по их происхождению, возрасту, таксономическим группам и т.д.;

3 – автором изучен большой объем растительного материала, однако, в различных разделах не прослеживается принцип единообразия (генотип, последовательность эксперимента и т.д.);

4 – содержимое рисунка 4 не соответствует ссылке на странице 79;

5 – в таблице 3 (стр. 80), температура отжига праймеров предлагается увеличивать до 72⁰С с целью увеличения специфичности. При какой температуре в данном случае будет осуществляться элонгация?

6 – судя по тексту, не ясно, в чем состоит оптимизация и разработка методов;

7 - некоторые выводы можно было бы представить в более глобальном аспекте, то есть в виде итогового заключения, обосновывающего решение важной проблемы в селекции овощных культур с использованием молекулярно-генетических методов;

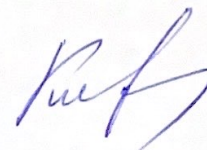
8 - в выводе 15 автор отмечает, что все ещё необходимо оптимизировать и адаптировать методы молекулярно-генетического маркирования, тогда как вся диссертационная работа посвящена именно решению этих вопросов, а автор, в итоге, рекомендует дальнейшую оптимизацию использованных методов. Считаю, что данный вывод не является конкретным выводом, а носит рекомендательный характер.

Заключение и оценка соответствия диссертационной работы предъявляемым требованиям. Замечания и уточнения по диссертационной работе, несущие рекомендательных характер, не снижают актуальность, степень научной новизны и практической значимости результатов проведённых исследований. Выполнен большой объем научной работы, получены новые научные знания и практические решения для селекции овощных культур. Диссертационная работа по методическому уровню и полноте выполнения поставленных задач в рамках общей цели исследования соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ (постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 года «О порядке присуждения учёных степеней»), 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
Калашникова Елена Анатольевна,
доктор биологических наук (03.00.23 – биотехнология), профессор,
профессор кафедры биотехнологии
ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева

2 марта 2022 г



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева»

Адрес: 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

Тел.: 8(916)927-73-19

e-mail: kalash0407@mail.ru

Подпись
заверяю

Е. А. Калашникова



Руководитель службы кадровой
политики и обмена персоналом

О.Ю. Чуркина
* 3 * О.Ю. Чуркина