

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Мавлютова Юлиана Муратовича на тему: «Разработка адаптированных методов молекулярно-генетического анализа для идентификации и ДНК-паспортизации сортов многолетних злаковых трав», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Мавлютова Ю.М. посвящена сложному и, несомненно, актуальному для селекции и семеноводства научному направлению – разработке эффективных методов для генетической идентификации и паспортизации сортов злаковых трав. Многолетние злаковые травы имеют важное значение как кормовые культуры, занимая значительное место в фитоценозах сенокосов и пастбищ, а также применяются для создания газонов и борьбы с эрозией почв. Злаковые травы обладают многими востребованными свойствами, такими как высокая пластичность, способность размножаться вегетативным путем, устойчивость к ряду вредителей и болезней Злаковых и многими другими. Наряду с неоспоримыми хозяйственно-практическими достоинствами, злаковые травы являются непростым объектом для генетических исследований и селекционной работы. Прежде всего сложность работы в данном случае связана с перекрестным опылением и самонесовместимостью, что приводит высокой генетической неоднородности между индивидуальными растениями сорта-популяции. Идентификация сорта, состоящего из множества биотипов, и его ДНК-паспортизация требуют разработки комплекса эффективных подходов и трудоёмкой поисковой работы. Сорта злаковых трав российской селекции слабо изучены с точки зрения перспектив успешной идентификации и паспортизации, поэтому считаю тему рассматриваемой диссертационной работы актуальной и очень востребованной для поддержания сохранности данных сортов и практической защиты авторских прав селекционеров, их создавших.

Научная новизна исследования. Автором действительно получены результаты, обладающие научной новизной. Впервые предложен метод генетической идентификации сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума отечественной селекции с использованием репрезентативной навески растительной ткани из 30 генотипов от каждого образца, подобран набор ДНК-маркеров, пригодных для идентификации изучаемых сортов. Также автор впервые изучил межсортовой и внутрисортовой полиморфизма у данных сортов и установил их филогенетические взаимоотношения, выявил особенности генетической структуры. На основе полученных результатов впервые были составлены генетические паспорта отечественных сортов райграса и фестулолиума, содержащие молекулярно-генетическую формулу, а также информацию о происхождении, основных морфобиологических свойствах и регионах возделывания.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. Рассмотрев данную диссертационную работу, я могу сказать, что выносимые на защиту положения, выводы и практические рекомендации, представленные в ней, основаны на полученных автором результатах экспериментов, без привлечения результатов других исследователей. Используемые автором методы подготовки проб и выделения ДНК, выбранные для анализа молекулярные маркеры (первое положение, выносимое на защиту) действительно позволяют эффективно дифференцировать сорта изучаемой коллекции. Считаю данное положение хорошо обоснованным. Сравнение внутрисортовой и межсортовой изменчивости (второе положение, выносимое на защиту) проведено на основе полученных автором экспериментальных данных, однако, считаю, требует подробного обсуждения и более подробного обоснования. Третье положение, выносимое на защиту (о создании генетических паспортов) считаю хорошо обоснованным и не подлежащим никакому сомнению. Выводы и практические рекомендации автор делает в полном соответствии с полученными результатами и вполне обосновано.

Практическая значимость работы. Данная диссертационная работа посвящена созданию адаптированных методов генотипирования отечественных

сортов злаковых трав для изучения генетического разнообразия и ДНК-идентификации, что имеет большое прикладное и теоретическое значение. Прежде всего, не вызывает сомнения, что использование предлагаемых автором молекулярно-генетических походов может повысить эффективность авторской защиты селекционных достижений и сократить затраты на регистрацию новых сортов при оценке их соответствия критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест). Результаты, полученные автором, могут иметь существенную практическую значимость для селекционного процесса, в частности, для характеристики исходного материала, подбора родительских форм, контроля гибридизации и т.д.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 142 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка литературы и приложений. Работа содержит 29 таблиц и 33 рисунка. Список использованной литературы включает 152 источника, в том числе 78 – на иностранном языке.

Во Введении (6 страниц) описывается актуальность темы исследования, формулируются цели и задачи исследования, представляется научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, декларируются положения, выносимые на защиту, приводится информация об апробации результатов работы публикациях и личном вкладе автора.

В первой главе диссертации (28 страниц) представлен обзор литературы, включающий ботаническую, биологическую и хозяйственную характеристику злаковых трав, основные направления селекции кормовых злаковых трав с особым акцентом на таких видах, как райграс пастбищный, райграс однолетний и фестулолиум, а также содержащий информацию об использовании ДНК-маркеров в селекционно-генетических исследованиях многолетних злаковых трав с характеристикой различных типов молекулярных маркеров.

Во второй главе диссертации (10 страниц) описаны материалы и методы. В главе содержится характеристика объектов исследования. Для каждого

исследуемого сорта указывается уровень ploидности и учреждения-оригинаторы. В главе также представлена характеристика SSR- и SCoT-маркеров, указаны их авторы и параметры использования. В последних двух пунктах главы описываются методы статистической обработки и валидации полученных данных.

В третьей главе диссертации (66 страниц) представлены полученные автором результаты и обсуждения. В начале главы подробно описывается оптимизация способов выделения ДНК и модификация условий ПЦР для оценки межсортового и внутрисортового полиморфизма. Далее последовательно излагаются результаты анализа сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума с использованием SSR- и SCoT-маркеров. Для каждого из видов автор описывает, как производился отбор информативных маркеров для дифференциации сортов и проводилось изучение особенностей генетической структуры по результатам анализа с использованием SSR- и SCoT-маркеров. Для SSR-маркеров на райгресе пастбищном и фестулолиуме также дополнительно приводятся результаты анализа внутрисортового ДНК-полиморфизма. В отдельных подпунктах данной главы автор приводит молекулярно-генетические формулы изучаемых сортов, состоящие из букв (кодируют определённые молекулярные маркеры) и индексов (показывают длины амплифицированных с помощью данных маркеров фрагментов). Завершается глава описанием разработки на основе полученных молекулярно-генетических формул молекулярно-генетических паспортов для сортов райграса и фестулолиума.

В главе Заключение (2 страницы) автор формулирует 4 вывода, основываясь на результатах проделанной работы.

Также в рукописи диссертации имеется список сокращений и условных обозначений (1 страница), список литературы (20 страниц) и 4 приложения (4 страницы).

Замечания и пожелания по содержанию и оформлению диссертационной работы:

1. Название не совсем точно отражает содержание рукописи. Вместо фразы “многолетних злаковых трав” уместнее было бы указать конкретные виды трав – райграс пастбищный, райграс однолетний и фестулолиум. Практически треть

работы посвящена райграсу однолетнему, поэтому обобщать его с многолетними злаковыми травами не совсем корректно.

2. В рукописи имеются неточности, опечатки и недостатки в оформлении, а именно:

- на стр. 5 автор пишет “В настоящее время в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации, находится более 400 сортов злаковых трав, представленных 47 видами”. Считаю такую формулировку некорректной, так как не сорта представлены видами, а виды представлены сортами.

- на стр. 6, 7 и в п. 1.2. при первом упоминании типов ДНК-маркеров следует ссылаться на авторов, впервые предложивших данный тип маркеров, а уже потом на работы, описывающие их использование для изучения злаковых трав. Данное условие соблюдается в указанных местах не всегда.

- на стр. 9 - опечатка: вместо “Сапрыки и др., 2020” следует писать “Сапрыкин и др., 2020”

- на стр. 20 помещена ссылка на публикацию Хлесткиной с неверным указанием года выпуска статьи. Указан 2015 год, на самом деле – 2013 год.

- на стр. 36, рис. 5 имеет очень низкое качество. Следовало бы отрисовать представленный график в графическом редакторе, а не вставлять скриншот из публикации, на которую дается ссылка. Это замечание можно отнести и некоторым другим рисункам в диссертации, которые были вставлены в текст рукописи сходным образом.

- на стр. 62 в табл. 7 и далее в аналогичных таблицах в последнем столбце указан только лишь диапазон размеров ПЦР-продуктов. Считаю, нужно указывать конкретные размеры для каждого аллельного варианта, выявленного с помощью представленных маркеров. Также считаю, что результаты, сведенные в табл. 7 и аналогичные ей таблицы должны быть подкреплены электрофореграммами, которые ввиду их значительного количества следовало бы поместить как приложения к рукописи.

- на стр. 68. результаты табл. 10 и рис. 12 дублируют друг друга. То же самое можно сказать и о табл. 25 с рис. 29 на стр. 107.

- на стр. 81 в табл. 13 столбец 3 следовало бы озаглавить не “Размеры полученных клонов”, а, например, “Длина секвенированных вставок”. Также на этой странице вместо фразы “отсеквенированных последовательностей” следовало бы написать фразу “секвенированных последовательностей”.

3. На стр. 37-38 автор излагает выводы Liu et. al., 2018 о количестве индивидуальных растений, составляющих “балк-образцы”, которое пригодно для достоверной дифференциации и идентификации популяций райграса. Это количество у Liu с соавт. равно 24. В диссертационной работе автор составляет “балк-образцы” из 30 индивидуальных растений. Возникает вопрос: почему не 24, ведь данное количество было экспериментально обосновано в цитируемой, предшествующей данному исследованию работе.

4. В описании табл. 10 крайне лаконично представлено объяснение генетических и биологических причин результатов, которые – между прочим – вынесены в одно из положений на защиту. Внутрисортовая изменчивость – 88%, а межсортовая – 10%. Является ли причиной получения таких результатов то, что изучаемые сорта представляют собой комбинации одних и тех же различающихся между собой генотипов, для меня остается только моей гипотезой. Автору следовало бы подробнее обсудить эти результаты. Аналогичное замечание могу сделать и к результатам в табл. 25.

5. Сравнения внутрисортовой и межсортовой изменчивости проводились автором только для SSR маркеров. Почему подобные сравнения не проводились для SCoT маркеров? Было бы целесообразно сопоставить результаты по разным типам маркеров или даже интегрировать их.

6. На стр. 85 автором представлена информация о том, что продукт амплификации с использованием маркера SCoT35 на райгресе пастбищном соответствует фрагменту генома бактерии *Stenotrophomonas rhizophila*. Данный результат поднимает масштабный вопрос, а являются ли результаты, полученные с помощью SCoT маркеров во всей рассматриваемой работе, результатами изучения

генетического сходства/различия сортов злаковых трав? Или результаты сходства/различия сортов сильно искажены наслоением результатов амплификации с матрицы ДНК представителей ризо- и эндосферы изучаемых растений?

7. В п. 3.15 автор сообщает, что полученные в ходе работ молекулярные формулы послужили основой для создания генетических паспортов сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума. При этом в диссертации приведены только 3 паспорта для райграса пастбищного (рис. 32, 32 и прил. 1), 1 паспорт для райграса однолетнего (прил. 2) и 1 паспорт для фестулолиума (прил. 3). Всего же в исследовании, согласно Материалам и методам, было использовано 25 сортов вышеназванных видов. В главе Заключение (п.4) автор пишет, что разработаны генетические паспорта для 10 сортов райграса пастбищного, 5 паспортов для райграса однолетнего и 6 паспортов для фестулолиума. В связи с этим возникают вопросы: 1) почему не приведены (хотя бы в виде приложений) недостающие генетические паспорта? 2) почему не были разработаны генетические паспорта для 4 сортов фестулолиума?

Общее заключение по оппонируемой работе. В целом, считаю, что автором была проделана большая трудоёмкая работа, которая дала действительно интересные и перспективные результаты. Несомненным достоинством диссертационной работы Мавлютова Ю.М. является тщательный подход к подготовке проб ДНК для анализа, к подбору информативных молекулярных маркеров, выявляющих большое число полиморфных аллелей, хорошее владение литературными данными для планирования и проведения требуемых экспериментов в рамках поставленных задач. Особо почеркну большой объём выполненных автором экспериментальных работ. Это очевидно из представленных в диссертации результатов. Считаю, что данная диссертационная работа соответствует требованиям Положения ВАК РФ о порядке присуждения научных степеней, а её автор, несмотря на вышеуказанные замечания, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Я согласен на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Ю.М. Мавлютова, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки РФ и ВАК при Минобрнауки РФ, в том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», сайте ВАК, в единой информационной системе.

Старший научный сотрудник

Лаборатории клеточной инженерии растений

ФГБНУ ВНИИСБ, кандидат биологических наук (03.02.07 – генетика, 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 2011 г.)

Тел. +7 915 096 84 72, эл. почта olegsandrov@gmail.com

08.02.2024

О.С. Александров

Подпись О.С. Александрова заверяю,

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ,

к.б.н.



Е.И. Федина

Федеральное государственное * бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), 127550, г. Москва, Тимирязевская, 42, Тел. +7 (499) 976-65-44, эл. почта: iab@iab.ac.ru