

УТВЕРЖДАЮ:
Заместитель директора ВИР

по научно-организационной работе,
кандидат биологических наук



Ю.В. Ухатова

9 февраля 2024 г.

О Т З Ы В

Ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР) о диссертационной работе Ю.М. Мавлютова «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 в диссертационный совет 35.2.030.08 ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева».

Актуальность исследований. Многолетние злаковые травы характеризуются ценными биологическими свойствами: высокой пластичностью, долголетием, способностью к вегетативному возобновлению, зимостойкостью, устойчивостью к вредителям и болезням. Злаковые травы – основа для получения разнообразных кормов (зелёная трава, сено, силос, сенаж), а некоторые виды применяют для создания газонов различного типа и рекультивации деградированных земель. В Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Российской Федерации, находится более 400 сортов злаковых трав, представленных 47 видами. Для сортовой идентификации многолетних злаковых трав используют, главным образом, морфологические признаки. Вследствие перекрестного опыления и самонесовместимости сорта злаковых трав являются гетерогенными популяциями, которые при этом обладают выраженным морфологическим сходством. С целью повышения эффективности сортовой идентификации, для решения ряда правовых вопросов в области растениеводства и семеноводства успешно применяются молекулярные ДНК-маркеры. Сортовая идентификация при этом основана на оценке аллельного состава в определенных областях генома с последующим

документированием результатов. Полученные данные могут использоваться для определения оригинальности и однородности сорта, подбора родительских форм для скрещиваний, контроля гибридизации и изучения филогенетических взаимосвязей в исследуемом материале. К сожалению, для большинства видов и сортов многолетних злаковых трав российской селекции не определены оптимальные системы молекулярного маркирования и наиболее эффективные способы сортовой идентификации. В этой связи тема диссертационной работы, посвященной разработке оптимизированных методов ДНК-анализа для идентификации и генетической паспортизации сортов многолетних злаковых трав с использованием систем SSR и SCoT-маркеров на основе ПЦР-технологии, безусловно, актуальна.

Научная новизна. С учетом высокой внутривидовой гетерогенности злаковых трав впервые предложен метод генетической идентификации сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума с использованием репрезентативной навески растительной ткани из 30 генотипов от каждого образца. Установлен набор ДНК-идентификационных SSR- и SCoT-маркеров, пригодных для определения сортовой принадлежности. На основе анализа межсортового и внутрисортового ДНК-полиморфизма сортов райграса и фестулолиума установлены филогенетические взаимоотношения образцов и изучены особенности генетической структуры исследуемых коллекций. Составлены ДНК-паспорта отечественных сортов райграса и фестулолиума, содержащие молекулярно-генетическую формулу, а также информацию о происхождении, основных морфобиологических свойствах и регионах возделывания.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработка адаптированных методов генотипирования для изучения генетического разнообразия и ДНК-идентификации многолетних злаковых трав позволяет получить новую информацию о закономерностях изменчивости в конкретной популяции, сорте, линии, генотипе в процессе репродукции, обогащают знаниями в области филогенетики и структуры геномов. Использование молекулярно-генетических методов на практике повышает эффективность авторской защиты селекционных достижений, сокращает затраты на регистрацию новых сортов при оценке их соответствия критериям отличимости, однородности и стабильности (ООС-тест). Данные, полученные в ходе молекулярного анализа образцов злаковых трав, могут быть востребованы в селекционном процессе: для характеристики исходного материала, подбора родительских форм, контроля гибридизации и маркирования хозяйственно ценных признаков.

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным объемом экспериментальных данных, которые представлены в диссертационной работе и статьях. Обоснованность результатов исследований обеспечена высоким уровнем теоретического и методического обоснования с использованием научных трудов ведущих исследователей. Достоверность экспериментов подтверждается математической обработкой полученных данных. Все приведенные в диссертационной работе научные положения, выводы и рекомендации, обоснованы.

Работа Ю.М. Мавлютова достаточно хорошо апробирована. Она была доложена на четырех российских и международных конференциях, по ее материалам опубликовано 12 работ, в том числе 2 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 4 – в журналах, индексируемых в Scopus/WoS. Получено свидетельство о государственной регистрации «Базы данных нуклеотидных последовательностей, идентифицирующих сорта кормовых культур» (№ 2023622067 от 22 июня 2023 г.).

Объём и структура 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 кратко рассматривается актуальность работы, указаны цель и задачи исследований, степень разработанности темы исследования, выносимые на защиту положения, методология, новизна и практическая значимость, апробация работы.

Представленный в диссертации Обзор литературы выполнен добросовестно и в основном отражает современный уровень изучаемых диссертантом вопросов. Соискатель показал хорошее знание отечественной и зарубежной литературы, последовательно и логично излагает материал. Представленный в главе материал свидетельствует о высоком уровне научной эрудиции автора, четком понимании задач исследования и путей их решения.

В главе «Материалы и методы» достаточно полно представлены сведения об объекте исследований, методах оценки ДНК-полиморфизма многолетних злаковых трав, статистической обработке данных. Используемые автором методики охарактеризованы достаточно полно и не вызывают возражений, эксперименты строились вполне корректно. Раздел удачно проиллюстрирован оригинальными фотографиями.

Экспериментальная работа диссертанта обобщена в главе «Результаты и обсуждение». Показано, что для выделения ДНК оптимален базовый метод хлороформфенольной экстракции, модифицированный применительно к объекту исследований. Определены оптимальный компонентный состав реакционной смеси для успешного проведения ПЦР с разными типами маркеров и температурный режим амплификации праймеров, а также наиболее эффективные способы детекции полученных результатов и методы статистической обработки данных. Изучен внутрисортной ДНК-полиморфизм райграса и фестулолиума. С использованием SSR- и SCoT-маркеров исследован межсортной ДНК-полиморфизм райграса пастбищного и райграса однолетнего, выполнена верификация результатов анализа. Данные по аллельному разнообразию сортов райграса пастбищного, райграса однолетнего и фестулолиума использовали для составления молекулярно-генетических формул. Наконец, в результате проведенных исследований по двум системам маркирования (SSR- и SCoT-маркеры) разработаны генетические паспорта многолетних злаковых трав: для десяти сортов райграса пастбищного, пяти сортов райграса однолетнего и шести сортов фестулолиума.

Выводы, сделанные диссертантом на основании экспериментальных данных достоверны, новы и вытекают из материалов, представленных в экспериментальной главе.

Текст диссертации содержит относительно немного опечаток, неудачных выражений и стилистических огрехов. Автореферат и опубликованные работы отражают основное содержание диссертации.

Рекомендации к использованию результатов диссертационной работы. Полученные автором результаты могут быть использованы в исследованиях генетического разнообразия многолетних злаковых трав, для получения новых сортов и их паспортизации. Результаты работы целесообразно внедрять в ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», Калининградский НИИСХ - филиал ФНЦ «ВИК им. В.Р. Вильямса», ФГБНУ «Федеральный научный центр лубяных культур», ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ФГБНУ «ФИЦК им. А.Г. Лорха»

Замечания.

1. Обнаружено, что межсортной разнообразие райграса, оцененное по 10 образцам райграса пастбищного и 5 образцам райграса вестервольдского, составляет всего 12%. Такой результат говорит о низком генетическом разнообразии сортов в опыте и об узкой генетической основе отечественных сортов райграса в целом. К сожалению, в исследование не были привлечены такие популярные

отечественные сорта райграса пастбищного, как Псковский местный Псковского НИИСХ, Малыш селекции Уральского НИИСХ и другие, а также образцы райграса из мировой коллекции ВИР, что позволило бы получить более репрезентативные данные.

2. В исследованиях использован семенной материал. Однако в главе «Материалы и методы» не указано, как его получали – при изоляции или свободном опылении? Где материал был репродуцирован? Отсутствие такой информации затрудняет интерпретацию результатов.
3. При описании результатов исследования широко используется термин «биотип» в качестве синонима понятия «генотип по локусу» (например, табл. 9, табл. 24). Согласно классическому определению, под биотипом понимают «совокупность особей в пределах популяции, имеющих сходный генотип и фенотип (напр., клон у растений). Биотип – интегральная характеристика генотипа, состав биотипов поддерживается в популяции в последовательных поколениях. В контексте данной работы биотип – это полученный с конкретной парой праймеров спектр продуктов ПЦР, отличающийся от другого спектра размерами полученных фрагментов. Непонятно, почему при определении числа биотипов автор суммировал число типов спектров продуктов ПЦР, полученных с разными праймерами.
4. В работе выявлены случаи некорректного использования терминов, отдельные недостатки в оформлении таблиц, в частности:
 - Не указано, что означают минусы в последней графе таблицы 1. Нет данных?
 - Непонятное выражение: «SSR-локусы под номерами с 7 по 14 (табл. 2) разрабатывались на основе библиотеки экспрессирующихся целевых сиквенсов (EST, Expressed Sequence Tags), связанных с различными аннотированными генами» – стр. 42. Очевидно, имелось в виду «праймеры к SSR-локусам...»
 - Стр. 45 – Некорректное название таблицы 3: Последовательности используемых SCoT-маркеров. Указаны последовательности праймеров, а не маркерных фрагментов. Правильно: последовательности праймеров, использованных для идентификации SCoT-маркеров.
 - Лучше вместо выражения «амплификация микросателлитных локусов» (локус – это точка на хромосоме) или «амплификация с SSR-маркером» (подрисуночные к рисункам 9 и 10) использовать: «амплификация микросателлитных маркеров».

- Некорректные подрисуночные подписи к рисункам 9 и 10 (заменить «амплификации образцов... с SSR-маркером» на «амплификации маркера у образцов»).
- Неудачные выражения: «полиплоидия сортов» (стр. 106), табл. 7 – «процент полиморфизма» (правильно – «доля полиморфных фрагментов»), табл. 13 – «Размер полученных клонов» (правильно – «Размер клонированных фрагментов»), табл. 7 – «Показатели эффективности SSR-локусов по результатам анализа...» (правильно – «Показатели эффективности системы маркирования на основе SSR-локусов»), подрисуночная подпись к рисунку 12 – «Схема электрофореграммы продуктов амплификации с SSR-локусом LPSSRh01h06» (правильно – «схема электрофореграммы продуктов амплификации в праймерах к SSR-локусу»). Повсеместно используется выражение «филогенетические связи между сортами» вместо «родственные связи между сортами».

Следует отметить, что указанные выше замечания не имеют принципиального характера и не влияют на общую высокую оценку работу, которую следует оценить как выполненную на высоком методическом уровне научно-квалификационную работу, а ее автора охарактеризовать как высококвалифицированного специалиста, владеющего современными методами исследований и способного к самостоятельному решению актуальных научных задач. Работа носит вполне законченный характер, а выводы автора вполне убедительны.

Заключение. Диссертационная работа Мавлютова Юлиана Муратовича «Разработка адаптированных методов молекулярно-генетического анализа для идентификации и ДНК-паспортизации сортов многолетних злаковых трав», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений, является законченной научно-квалификационной работой.

По степени актуальности темы, уровню полученных научных результатов, степени их новизны, теоретической и практической значимости, а также форме и содержанию диссертационная работа «Разработка адаптированных методов молекулярно-генетического анализа для идентификации и ДНК-паспортизации сортов многолетних злаковых трав» отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Мавлютов Юлиан Муратович, несомненно,

заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании отдела генетики Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова 6 февраля 2024 г., протокол № 1.

Ведущий научный сотрудник отдела генетики
Всероссийского института генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,
доктор биологических наук по специальности
03.00.15 (03.02.07) – генетика



Анисимова Ирина Николаевна

Руководитель отдела генетики
Всероссийского института генетических
ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,
главный научный сотрудник,
доктор биологических наук по специальностям
03.00.15 (03.02.07) – генетика и
06.01.05 – селекция и семеноводство



Радченко Евгений Евгеньевич

Подписи И.Н. Анисимовой и Е.Е. Радченко заверяю
Ученый секретарь ВИР,
кандидат сельскохозяйственных наук



О.С. Ефремова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)
ул. Большая Морская, д. 42, 44, Санкт-Петербург, 190031
Тел. (812)312-51-61, (812)314-22-34; e-mail: secretary@vir.nw.ru