



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

06.05.2016 № 12312 -2171

На № _____ от _____

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Савельевой Екатерины Николаевны
«Изучение генетического разнообразия рода *Malus* Mill. (яблоня) с
помощью ДНК-маркеров», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.02.07 – Генетика

Яблоня - одна из самых распространенных и важных плодовых культур, однако вопросы филогении и таксономии видов рода *Malus* решены не полностью. Род *Malus* является довольно неоднородным в силу высокого уровня межвидовой гибридизации, его таксономическая классификация затруднена. В настоящее время род *Malus* активно изучают на молекулярно-генетическом уровне с целью уточнения эволюционных взаимоотношений. Особое внимание уделяется поиску генов устойчивости к заболеваниям у различных видов яблони. В то же время, российские коллекции яблони остаются недостаточно изученными. Диссертационная работа Савельевой Е.Н. посвящена изучению генетического разнообразия рода *Malus* с

использованием методов молекулярного маркирования, исследованы яблони отечественных коллекций, включая сорта народной селекции Антоновки.

Диссертация имеет классическую структуру, состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений, Публикации по теме диссертации, Список литературы. Работа изложена на 142 страницах, содержит 6 таблиц и 18 рисунков, список литературы включает 267 источников.

Во **Введении** изложена актуальность темы, сформулированы цели и задачи диссертационной работы. Также обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследований. Постановка задач диссертации логична, задачи решаются на современном уровне.

Глава 1 (Обзор литературы) состоит из четырех разделов. Первые два раздела включают в себя биологические сведения об объекте исследования (род *Malus*), подробно рассматриваются вопросы систематики яблони, автор детально описывает исследование происхождения и филогенетических взаимоотношений видов рода *Malus*. Третий раздел посвящен различным типам молекулярно-генетических маркеров. Автор выделяет три подпункта, в каждом из которых характеризуется определенная группа молекулярных маркеров. Подробно описано применение маркеров для изучения генетического разнообразия и филогении растений. Помимо этого, затронут вопрос маркирования хозяйственно-ценных признаков растений. Четвертый раздел носит название «Современное состояние молекулярно-генетических исследований рода *Malus* Mill.». Наличие данного раздела логично и обоснованно, в нем автор описывает, какие исследования с использованием методов молекулярно-генетического анализа уже были проведены на яблоне. В целом, обзор литературы содержит исчерпывающие сведения о современном состоянии исследований в области таксономии яблони и

использовании молекулярных маркеров для изучения генетического разнообразия.

Глава 2 состоит из шести разделов, в которых подробно описаны **материалы и методы** исследования. Первый раздел содержит сведения о собранной коллекции образцов рода *Malus* (полные названия видов/сортов, принадлежность к секциям, каталожные номера). Второй раздел включает в себя описание методики выделения ДНК из растительного материала. Третий раздел дает информацию о методике проведения секвенирования и статистического анализа нуклеотидных последовательностей участка ITS1-5.8S ядерного генома образцов яблони. В четвертом разделе подробно описаны методики проведения AFLP-, S-SAP-анализа, а также NBS-профайлинга образцов рода *Malus*. Приведены последовательности использованных в работе праймеров, адаптеров, описана разработка S-SAP-маркеров и методика постановки ПЦР. Пятый раздел посвящен методике проведения электрофореза амплифицированных фрагментов ДНК. В шестом разделе описаны анализ результатов и статистическая обработка данных. Используемые методы позволяют решить поставленные в диссертационной работе задачи, являются современными и соответствуют международному уровню исследований.

Глава 3 (Результаты и обсуждение) включает в себя пять разделов. Представленные автором результаты наглядно иллюстрированы графическим материалом. Первый раздел посвящен ITS-анализу образцов рода *Malus*. Подробно описывается протяженность секвенированных фрагментов, наличие замен, видоспецифичных инсерций. Выявленный автором уровень нуклеотидного полиморфизма изучаемого фрагмента оказался невысоким, составил 14%. Такой результат автор объясняет как схожестью геномов образцов яблони, так и наличием межвидовой гибридизации, а также небольшой длиной секвенированных последовательностей. Все секвенированные нуклеотидные

последовательности района транскрибируемого спейсера ITS1 и гена 5.8S рРНК у отобранных образцов рода *Malus* депонированы в базе данных GenBank.

Второй раздел главы описывает результаты AFLP-анализа образцов рода *Malus*. Выявлен высокий уровень межвидового полиморфизма (90,2%). Автор опирается на построенную PCO-диаграмму по данным AFLP-анализа, указывает на наличие нескольких групп образцов и гибридных видов между ними. Установлена видовая принадлежность сортов народной российской селекции Антоновок - все они относятся к виду *M. domestica*, и яблони Якутская - предположительно вид *M. baccata*. Автор показал, что виды *M. sargentii* и *M. sieboldii*, вероятно, относятся к секции *Gymnomeles*.

Третий раздел посвящен S-SAP-анализу образцов рода *Malus*. Автором впервые изучено генетическое разнообразие рода *Malus* при помощи S-SAP-анализа сайтов встраивания LTR-ретротранспозонов *Ty3-gypsy-like dem1* и TRIM2. Показан высокий уровень межвидового полиморфизма (95,9%). Автор построил две PCO-диаграммы для каждого из ретротранспозонов, результаты на них довольно схожи, но диаграмма для ретротранспозона *dem1* показала очень слабую дифференцировку образцов. Автор объясняет это тем, что каждый ретротранспозон имеет собственную историю распространения в геноме растения, и TRIM2, вероятно, был более активен в момент дивергенции рода *Malus*, поэтому S-SAP маркеры, созданные на его основе лучше дифференцировали образцы, чем маркеры, созданные на основе ретротранспозона *dem1*. На диаграммах выделены группы концентрации образцов яблони, автор ассоциирует их с четырьмя секциями рода *Malus*, хотя, отмечено, что в целом род слабо дифференцирован из-за наличия высокого уровня межвидовой и внутривидовой гибридизации. Автор также проводит кластеризацию смоделированных обобщенных генотипов истинных видов, исключая гибридные образцы яблони. Такие генотипы, по словам автора, характеризовался наиболее частым для вида состоянием по

каждому из 264 маркеров ретротранспозона TRIM2. Данный подход позволил улучшить разделение образцов на группы. Таким образом, S-SAP-анализ подтверждает и дополняет результаты AFLP-анализа, и показывает правомерность использования LTR-ретротранспозонов для анализа яблони.

Четвертый раздел демонстрирует результаты NBS-профайлинга образцов рода *Malus*. В настоящее время данный метод молекулярного маркирования широко используется для анализа внутри- и межвидового полиморфизма последовательностей семейства NBS-LRR генов резистентности (R-генов) у различных видов растений. Уровень межвидового полиморфизма, выявленный автором, составил примерно 79%. По аналогии с предыдущими исследованиями, автор строит PCO-диаграмму, отмечает, что в целом, полученные данные по NBS-профайлингу образцов рода *Malus* совпадают с данными, полученными в результате AFLP- и S-SAP-маркирования, хотя положение Антоновок отличается тем, что они обособлены и от диких видов, и от домашних яблонь. Далее, автор ставит целью найти те уникальные последовательности Антоновок, которые позволили объединить их в единую группу. Для этого полученные по NBS-профайлингу данные были проанализированы методом двумерного кластерного анализа. Алгоритм программы была разработан в лаборатории генетики растений ИОГен РАН на базе программы STATISTICA v.6. Автор выделяет две группы фрагментов, которые, вероятно, являются маркерами уникальных генов устойчивости Антоновок к заболеваниям. Автор рекомендует Антоновки для использования в селекции при создании новых более устойчивых к заболеваниям сортов яблони.

Пятый раздел объединяет все полученные данные. Здесь проводится обсуждение ранее полученных результатов, сравнение методов, выявление наиболее информативных маркеров. Ключевой фразой можно считать заключение автора о том, что изучать генетическое разнообразие рода *Malus*

необходимо в комплексе с применением различных методов молекулярно-генетического анализа.

Сделанные в диссертации **выводы** обоснованы, соответствуют поставленным целям и полученным результатам. Научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость представленной работы не вызывает сомнений. Впервые для молекулярно-генетического анализа образцов рода *Malus* из отечественных коллекций были использованы AFLP и S-SAP методы, а также NBS-профайлинг. Особый интерес представляет исследование сортов народной селекции Антоновки, которые ранее практически не изучались. На основании результатов работы приведены рекомендации по использованию Антоновок в качестве родительских форм в селекции при получении новых устойчивых к заболеваниям сортов яблони.

Результаты диссертации опубликованы в пяти работах, из них две – в журналах из списка ВАК, а также представлены на отечественных и зарубежных конференциях. Автореферат полностью соответствует тексту диссертации.

Можно отметить некоторые недостатки представленной работы.

На ряде рисунков использован слишком мелкий шрифт, что затрудняет анализ результатов. Допущены неточности, например, при обозначении уровня полиморфизма в качестве разделителя в одних местах использовалась точка, а в других - запятая. Кроме того, в списке литературы не соблюдается шрифт и стиль у источника номер 191, а источник номер 46 полностью выделен курсивом. Однако данные недочеты не снижают общей положительной оценки работы.

В заключение следует отметить, что диссертант владеет современными методами исследования и успешно решил стоявшие перед ним цели и задачи. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Диссертационная работа «Изучение генетического разнообразия рода *Malus* Mill. (яблоня) с помощью ДНК-маркеров» полностью соответствует

требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, Положения о порядке присуждения ученых степеней постановления правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Автор работы, Савельева Екатерина Николаевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Кандидат биологических наук,
научный сотрудник Лаборатории постгеномных исследований
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук
119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д. 32.
Тел. +7(916)550-05-36
e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

Мельникова Наталия Владимировна



Подпись Мельниковой Н.В. заверяю

Савельев А.А.