

Отзыв официального оппонента

на диссертацию

Екатерины Николаевны Савельевой

**"ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РОДА MALUS MILL.
(ЯБЛОНЯ) С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ"**

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика

Диссертация Екатерины Николаевны Савельевой посвящена исследованию генетического разнообразия видов и сортов яблонь, выявляемого с использованием разных типов молекулярно-генетических маркеров. Актуальность работы не вызывает никаких сомнений, так как род *Malus* имеет исключительное хозяйственное значение, многие вопросы его генетики и систематики еще весьма далеки от окончательного решения, а о видовом составе рода существуют достаточно противоречивые мнения. Целью работы являлось изучение внутри- и межвидового генетического разнообразия рода *Malus* при помощи различных молекулярных маркеров, в том числе, для оценки родственных связей и уточнения вопросов филогении и систематики этого рода, а также установления видовой принадлежности Антоновок – отечественных сортов народной селекции. Работа представляет собой целостное завершенное исследование.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Глава состоит из нескольких разделов, первый из которых посвящен обзору биологических особенностей объекта исследования. Здесь приводятся сведения о числе хромосом, гибридизации и системах размножения в роде *Malus*. Во втором разделе главы рассматриваются вопросы систематики и филогении изучаемого рода. Автор отмечает, что существует несколько систем рода *Malus*, предложенных разными авторами с 1940 по 2012 годы, различающихся числом признаваемых видов (от 25 до 78) и секций (от 5 до 6). При этом, сама Екатерина Николаевна рассматривает, преимущественно,

только классификацию Лангенфельда 1991 г., принимая ее за основу для своей работы. Почему был сделан такой выбор, ни из текста раздела, ни из дальнейшего изложения, ясно не становится. Надо отметить, что в тексте раздела встречается целый ряд крайне неудачных выражений, смысл которых не вполне понятен и требует пояснения: «простые виды», «исконные виды», «истинные виды», «древние по происхождению яблони», «первичные яблони», «Типичная секция рода». Несколько странно выглядит пассаж на стр. 13, где автор обсуждает таксономическое положение *Malus florentina*. Сперва она пишет, что этот вид распространен в северной Италии, однако несколькими предложениями дальше читаем, что «Cheng *et al.* (2001) описал вид *M. florentina* как китайский вид, также выделяя его в новую секцию *Florentinae*». Непонятно, как кто-то мог снова описать уже давно описанный вид, да еще и из совершенно другого региона. Также несколько непоследовательным со стороны автора выглядит использование креста, обозначающего гибридные комбинации в названиях видов для всех видов предположительно гибридного происхождения, кроме *Malus domestica*, которая, несомненно, является гибридом, причем весьма сложным и для разных сортовых групп – разным.

Раздел 1.3 посвящен обзору различных типов маркеров ДНК, используемых в молекулярно-генетических исследованиях. Обзор избыточен, так как в нем описывается много типов маркерных систем, не только не использовавшихся автором в своей работе, но и никогда не использовавшихся для изучения яблонь или даже других групп розоцветных. Из раздела, тем не менее, можно понять, что автор работы достаточно неплохо разбирается в разных системах генетических маркеров, используемых для исследования сельскохозяйственно важных растений.

В разделе 1.4 рассматривается современное состояние молекулярно-генетических исследований видов рода *Malus*. Указывается, что большинство такого рода исследований связано с поиском генетических маркеров, связанных с генами устойчивости яблони к болезням и различным вредителям и их использованием в маркер-опосредованной селекции новых более устойчивых сортов. Отмечается, что геном яблони секвенирован полностью и картирован с использованием различных систем маркеров.

Глава 2 диссертации посвящена описанию материала и методов исследования. Автором исследованы 133 образца растений, относящихся к различным сортам домашней яблони, а также дикорастущих видов яблонь и известным межвидовым гибридам из коллекций ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, Майкопской опытной станции Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства им Н.И. Вавилова (Майкоп – Санкт-Петербург) и ГБС РАН. Таким образом, Е.Н. Савельевой охвачена значительная часть генетического разнообразия рода *Malus*. Исследованные образцы относятся ко всем известным таксономическим секциям рода и включают европейские, азиатские и североамериканские виды, целый ряд предположительно спонтанных и искусственных гибридов и множество культурных сортов яблони. Для оценки генетической изменчивости использованы секвенированные последовательности ядерного внутреннего транскрибируемого спейсера ITS1, а также несколько различных систем маркеров для фрагментного анализа: AFLP, S-SAP и NBS-профайлинг. Существенно в данном случае то, что последняя система предположительно не является нейтральной, а связана с генами, подверженными отбору. Методы выделения ДНК и проведения ПЦР и электрофореза для получения всех типов маркеров охарактеризованы достаточно подробно и соответствуют принятым протоколам. При статистической обработке данных фрагментного анализа в качестве меры генетического сходства всюду единообразно использовался коэффициент сходства Дайса, или коэффициент сходства Нея и Ли. Формула расчета коэффициента указана правильно, но в описании ее допущена ошибка, так как эта мера сходства, на самом деле, не учитывает одновременного отсутствия бэндов (стр. 65).

Глава 3 диссертации посвящена описанию и обсуждению полученных результатов. В разделе 3.1 рассматриваются результаты анализа последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомальной ДНК ITS1. Анализ последовательностей проводился в программе MEGA 5.1 методом объединения соседей (Neighbour Joining, NJ). В разделе полученное дерево достаточно подробно описывается. Вместе с тем, дерево, приведенное на рисунке 8 (стр. 72), явно не является деревом, построенным методом NJ. Это типичная кладограмма, более всего оно напоминающая консенсусное дерево, построенное

методом максимальной экономии. Это понятно из равенства длин ветвей для всех терминальных групп. Это означает, что дерево отражает только чисто кладистические отношения между терминальными группами, без учета длин ветвей, рассчитанных в соответствии с тем или иным коэффициентом сходства. На дереве, построенном методом NJ, длины ветвей всегда резко неравны и пропорциональны генетическим дистанциям между терминальными группами, а масштаб этих дистанций обычно указывается рядом с деревом. Здесь никакого масштаба не приводится. Так что, каким методом автор анализировала выравнивание последовательностей ITS1, остается не вполне ясным. Следует отметить, что в целях оценки именно родства исследуемых видов яблони, а не просто оценки их сходства, использование метода максимальной экономии представляется более корректным.

Раздел 3.2 Посвящен анализу образцов методом AFLP. Для 90 исследованных образцов диссертанту удалось получить 399 AFLP фрагментов, 360 из которых оказались полиморфными. Полученные данные были представлены в виде бинарной матрицы и проанализированы методом главных координат. Результаты проведенной ординации в плоскости первых двух главных координат показывают довольно слабое разделение образцов, которые Екатерина Николаевна все же разделяет на 4 группы, более или менее соответствующие традиционному таксономическому делению рода. При этом проясняется, к каким видам наиболее близки многие ранее неисследованные в генетическом отношении сорта яблони. В частности, показано, что все сорта Антоновок группируются вместе с другими образцами различных сортов *M. domestica*. Напротив, яблоня Якутская, группируется вместе с видами секции *Gymnomeles* и, видимо, представляет собой одомашненную форму *M. baccata*. Часть образцов («гибридные виды») при этом не попадает ни в одну из групп и располагается на диаграмме разброса между ними. К сожалению, в работе не указано (в т.ч. и в последующих разделах, где также использовалась ординация методом главных координат) какой процент дистанций описывается первой и второй главными координатами. Это является существенным упущением, так как доля описываемых дистанций показывает качество проведенной ординации и степень соответствия полученной картины исходным дистанциям в матрице. К сожалению, по непонятной мне причине, автор отказалась от проведения

кластерного анализа этих данных, что, на мой взгляд, значительно упростило бы их сравнение и дальнейшую интерпретацию. Приведенная в конце раздела на странице 78 интерпретация результатов ординации AFLP маркеров по ряду пунктов представляется достаточно спорной. Так, утверждение автора, что «AFLP-анализ позволил уточнить филогенетические связи внутри рода» не соответствует действительности, так как ординация методом главных координат позволяет лишь приблизительно оценить степень генетического сходства отдельных образцов, но никак не их филогенетические связи. Также утверждение о том, что «данные свидетельствуют еще раз о том, что именно вид *M. sieversii* был предком не только яблони домашней, но и других видов секции *Malus*» представляется весьма спорным. То, что изученные образцы *M. sieversii* попадают в одну группу с образцами сортов яблони домашней, а также образцами *M. sylvestris* и других видов секции *Malus* еще ничего не говорит об их филогенетических отношениях, а только лишь об их большем генетическом сходстве друг с другом.

Раздел 3.3 описывает результаты S-SAP анализа, основанного на изменчивости двух типов ретротранспозонов. В данном случае для анализа полученных результатов использованы не только ординация методом главных координат, но и кластеризация методом NJ. S-SAP анализ позволил автору сгенерировать 708 фрагментов, из них 679 полиморфных, что позволяет его рассматривать, как весьма продуктивный для анализа генетического сходства яблонь. Выводы раздела сформулированы достаточно корректно и, в целом, соответствуют результатам, полученным с помощью AFLP маркеров.

В разделе 3.4 описаны результаты NBS-профайлинга, проанализированные также методом главных координат. В целом, полученные результаты совпали с результатами, полученными по AFLP и S-SAP маркерам. Проведенный дополнительно двумерный кластерный анализ дал, на мой взгляд, довольно невнятные и плохо интерпретируемые результаты. Вместе с тем, автору удалось на полученной двумерной диаграмме (рис. 18 на стр. 99) выделить два участка, содержащих маркеры R-генов, специфичных для сортов Антоновок, что может указывать на их групповые отличия от прочих сортов домашней яблони по генам устойчивости. Эти результаты могут быть в дальнейшем использованы для маркер-

опосредованной селекции. Вместе с тем, существенное совпадение результатов анализа NBS-LRR последовательностей с таковыми, полученными по данным AFLP и S-SAP, указывает на то, что эта система маркеров также является нейтральной и в подавляющей части не связана с генами, подверженными значительным давлениям отбора. В противном случае в результатах анализа наблюдались бы какие-то существенные отличия.

В целом, можно отметить, что автором получены достаточно согласованные результаты по всем системам маркеров. Они позволяют разделить изученную выборку на 3-5 групп, в значительной мере совпадающих с традиционной морфологической классификацией рода *Malus* и предшествующими молекулярно-филогенетическими данными других авторов. Наименее полиморфными, вполне ожидаемо, оказались секвенированные последовательности ITS1, лучшее разрешение дали результаты разных вариантов фрагментного анализа.

В целом, выводы диссертации сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам и их обсуждению в тексте диссертации.

Полученные Екатериной Николаевной результаты в достаточной степени апробированы на ряде российских и международных конференций. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций. Проведенное исследование выполнено на высоком научном уровне и вполне соответствует критериям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

В заключение следует сказать, что, несмотря на целый ряд критических замечаний, высказанных в данном отзыве, работа производит достаточно благоприятное впечатление. Насколько можно судить из текста диссертации, автором проделана очень большая работа по получению различных типов молекулярно-генетических маркеров из большого числа видов рода *Malus* и сортов яблони домашней, анализу и обобщению полученных данных и формулировке представлений об объеме и родстве изученных таксонов генетических групп сортов. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

По своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная диссертация соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Екатерина Николаевна Савельева, достойна присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07. – «Генетика».

Отзыв представил:

Шанцер Иван Алексеевич _____,

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории Гербарий

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук

Адрес: Москва 127276, Ботаническая ул., д. 4

Телефон: 8(499)977-8033

e-mail: ischanzer@gmail.com

Дата: 4 мая 2016 г.

Подпись И. А. Шанцера заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
ГЛАВНОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА им. Н.В. Цицина
Российской академии наук Савельева

