

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу  
**Филюшина Михаила Александровича** на тему: «**Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium***», представленную в диссертационный совет Д.002.214.01 при Федеральном государственной бюджетном учреждении науки Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
03.02.07 – Генетика.

### Актуальность темы диссертационной работы

Изучение генетических ресурсов с привлечением современных технологий позволяет намного эффективнее использовать имеющееся генетическое разнообразие для создания сортов культивируемых растений с заданными свойствами. Род *Allium* L. (сем. Amaryllidaceae) – один из крупнейших родов однодольных растений и включает более 800 видов, ряд из которых являются важными овощными культурами. Чеснок *A. sativum* занимает второе место среди луковых культур по объему производства, но, несмотря на свою высокую значимость, геном *A. sativum* исследован недостаточно, неясна филогения данного вида, не определено его положение в секции *Allium*. Диссертационная работа Филюшина М.А. посвящена изучению геномного полиморфизма чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium* методами мульти- и монолокусного анализа. Всего было проанализировано 153 образца рода *Allium*, включая 80 образцов чеснока из коллекции ВИР, 43 образца дикорастущих видов секции *Allium*, собранные и предоставленные ведущими специалистами по роду *Allium* – Николаем Фризенем (Ботанический сад университета Оснабрюк, Германия) и Рейнардом Фритчем (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Гатерслебен, Германия), а также образцы видов из других секций рода *Allium*. Исследования проведены с использованием современных

молекулярных методов анализа генома, таких как AFLP, NBS-профайлинг, секвенирование, ПЦР в реальном времени. Такие исследования пополняют наши знания об организации, функции и эволюции геномов растений, что, в конечном итоге, послужит сохранению генетических ресурсов и их бережному и эффективному использованию, поэтому актуальность диссертационной работы Филошина М.А. не вызывает сомнений.

### **Научная новизна**

Диссертантом впервые проведен комплексный анализ 80 образцов *Allium sativum* различного эколого-географического происхождения из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) двумя методами мультилокусного анализа генома – AFLP, который маркирует селективно-нейтральные фрагменты генома, и NBS (Nucleotide-binding site)-профайлинг, который маркирует адаптивно-значимые фрагменты (гены устойчивости), содержащие NBS-домен. Данными методами выявлен довольно высокий уровень внутривидового геномного полиморфизма, сопоставимый с таковым у перекрестно-опыляемых видов растений. Также, с применением комплексного подхода (AFLP-анализ, анализ нуклеотидных последовательностей ядерного, пластидного и митохондриального геномов) проведен филогенетический анализ секции *Allium*. По результатам исследований высказано предположение об общности происхождения цитоплазматических геномов для двух групп аллополиплоидных видов.

Автором впервые определена и аннотирована полная нуклеотидная последовательность пластидного генома чеснока *Allium sativum*; проведен сравнительный анализ с известным пластидным геномом *Allium sepa*, выявлены протяженные индели, локализованные в межгенных областях и различия на границах инвертированных повторов. Впервые для видов *Allium* идентифицированы и описаны гены, кодирующие белки с доменом холодового шока, показано существование у растений белков холодового шока с восемью цинковыми пальцами, изучена экспрессия этих генов в

вегетативных органах чеснока при нормальных температурных условиях и при холодном стрессе (+4<sup>0</sup>C).

### **Научная и практическая значимость результатов исследования**

Полученные соискателем в диссертационной работе результаты в будущем могут быть использованы в филогенетических исследованиях рода *Allium*, а также могут найти применение в селекции новых сортов чеснока. Выявленные среди анализируемых образцов чеснока *A. sativum* генотипы из коллекции ВИР, отличающиеся по спектрам AFLP-фрагментов и набору NBS-фрагментов, могут быть предложены для использования в селекционных программах по созданию новых сортов чеснока.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Филюшина М.А. изложена на 141 странице текста и содержит 12 таблиц и 41 рисунок. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 231 источник.

Во введении диссертант дает краткое обоснование важности исследования генетического разнообразия чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*, обосновывает актуальность темы своих исследований, кратко рассматривается разработанность темы, формулирует цель и задачи работы, аргументирует теоретическую и практическую значимость.

В главе «Обзор литературы» автором изложены систематика, таксономическое строение и ботаническая характеристика рода *Allium*, приведены сведения о происхождении, истории возделывания и использовании чеснока *Allium sativum*. Также, автор приводит имеющиеся на сегодняшний день гипотезы о причинах стерильности чеснока. Отдельная подглава посвящена обзору генома растений и методов его исследования, кратко описаны два метода мультилокусного анализа генома (AFLP и NBS-профайлинг), проведен аналитический обзор результатов, полученных с

помощью данных методов исследователями в различных лабораториях мира. Проведен обзор работ по изучению генома луковых и генома *Allium sativum* в частности.

В главе «Материалы и методы» приведены сведения об используемой в работе коллекции образцов рода *Allium* и видов других родов порядка Asparagales, включающей 158 образцов. Для каждого исследуемого образца указаны методы, с помощью которых данный образец был изучен (табл. 2.1). Кратко описаны используемые в работе методы анализа генома.

В главе «Результаты и обсуждения» полученные автором результаты, а также их интерпретация и обсуждение изложены в отдельных подглавах в соответствии с поставленными задачами. Первая подглава посвящена изучению генома чеснока *Allium sativum* двумя методами мультилокусного анализа – AFLP и NBS-профайлинг. Выявленный этими методами уровень варибельности генома вегетативно размножаемого чеснока *A. sativum* оказался достаточно высоким и сопоставимым с таковым у перекрестно-опыляемых видов растений.

Во второй подглаве для сравнительной оценки варибельности генома чеснока этими же двумя методами анализа генома исследован внутривидовой полиморфизм другого представителя секции *Allium* – лука-порея *A. porrum*, который в отличие от чеснока является перекрестно-опыляемым. Полученные значения геномного полиморфизма лука-порея *A. porrum* оказались существенно ниже таковых у *A. sativum*.

Третья подглава посвящена филогенетическому анализу секции *Allium* по результатам AFLP-анализа и анализа отдельных нуклеотидных последовательностей ядерного (ITS1-5.8S-ITS2), хлоропластного (спейсеры *rpl32-trnL*, *ndhJ-trnL*, *petN-psbM*, *trnC-petN*, *trnT-trnL* и интрон гена *rps16*) и митохондриального (b/c интрон гена *nad1*) геномов. Для большинства исследуемых видов луков эти нуклеотидные последовательности были проанализированы впервые. Подробно описывается полиморфизм каждого анализируемого участка, выявленные образец- и видоспецифичные индели.

Приводится сравнительный анализ дерева, построенного по результатам AFLP-анализа и дерева, построенного на основе нуклеотидных последовательностей.

Следующая подглава посвящена секвенированию и анализу полной последовательности пластидного генома чеснока *Allium sativum*. Автором разработано 11 пар праймеров (последовательности почему-то не приводятся), с помощью которых были амплифицированы протяженные перекрывающиеся фрагменты хлоропластного генома, которые затем были секвенированы на Illumina HiSeq1500. Проведена аннотация генома и его сравнительный анализ с секвенированным ранее пластомом *Allium cepa*.

Пятая подглава посвящена идентификации и анализу генов «холодового шока» у видов рода *Allium*. У четырех видов *Allium* идентифицированы и описаны три гена, кодирующие белки с доменом холодного шока, которые различаются числом цинковых пальцев. Впервые показано существование у растений белков холодного шока с восемью цинковыми пальцами. Изучена экспрессия трех генов «холодового шока» в вегетативных органах чеснока при нормальных температурных условиях и при холодном стрессе (+4<sup>0</sup>C), показано, что воздействием холодного шока уровень экспрессии данных генов значительно увеличивается только в видоизмененном стебле (донце).

В заключении обобщены полученные результаты, которые представляют интерес в фундаментальных исследованиях по филогении и таксономии представителей данного рода; также дана оценка данных, полученных по изучению белков холодного шока и уровню их экспрессии, что, несомненно, имеет важный практический выход.

Выводы четко сформулированы на основании полученных данных.

### **Обоснованность и достоверность выводов**

Все выводы основаны на полученных автором экспериментальных данных и соответствуют поставленным задачам. Исследование Филюшина М.А. проведено на высоком научно-методическом уровне, с применением современных методов анализа генома. Статистическая обработка результатов и оценка достоверности результатов проведена с использованием современных статистических программ. Научные положения и выводы подтверждаются литературными данными.

#### **Подтверждение основных результатов диссертации в научной печати**

Полученные диссертантом результаты нашли отражение в публикациях автора, в том числе в 4 научных статьях в рецензируемых научных журналах (журналы «Генетика» и «Молекулярная биология» входят в перечень ВАК, журнал «Mitochondrial DNA. Part B Resources» рецензируется в базе Web of Science), а также в тезисах отечественных и международных конференций.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, кратко изложена проделанная работа и полученные результаты.

#### **Вопросы и замечания к диссертационной работе**

1. Почему сравнительный анализ последовательности пластидного генома чеснока проведен только с одной последовательностью пластома *A. сера* (KF728079), в базе NCBI помимо этого доступны еще три последовательности пластома *A. сера* (фертильные и стерильные генотипы)?
2. Почему был отобран только один референсный ген (актин) для определения уровня экспрессии генов кодирующих протеины холодового шока (CSP) методом ПЦР в реальном времени. В ряде работ было показано, что комбинация стабильно экспрессирующихся референсных генов необходима для точного анализа результатов количественного ПЦР (qPCR).
3. - стр. 55 диссертант пишет: «Выявленные образцы, отличающиеся по набору NBS-фрагментов от остальных образцов, могут быть рекомендованы для включения в селекционный процесс для создания новых устойчивых к

фитопатогенам сортов *A. sativum*». Наличие полиморфизма по набору NBS-фрагментов еще не говорит об устойчивости к фитопатогенам. Необходимо показать ассоциацию определённого R-гена или его аллеля с реальной устойчивостью в "поле". Можно лишь **предполагать**, что исследованные образцы проявят полиморфизм не только по R-генам, но и по устойчивости, как признаку.

4. В работе были использованы AFLP и NBS-профайлинг для анализа полиморфизма. На видах *Solanum* было показано, что результаты NBS-профайлинга и AFLP были сопоставимы. Насколько сопоставимы были результаты, полученные на видах *Alliums* с использованием этих двух систем ДНК фингепринтинга?

5. Наименование подглавы 3.2. не совпадает в Содержании («Анализ полиморфизма генома лука-порея *A. porrum* методом AFLP») и в тексте диссертации («Анализ полиморфизма генома лука-порея *A. porrum* методами AFLP и NBS-профайлинга»).

6. В тексте диссертации нуклеотидные замены обозначаются автором не по общепринятой форме (например, вместо T/G<sub>871</sub> правильной указывать T871G).

Высказанные замечания, однако, не касаются основных результатов диссертационной работы, определяющих ее новизну и научную значимость, поэтому не снижают общей высокой положительной оценки работы.

### **Заключение**

По уровню научной значимости полученных результатов, по их новизне и оригинальности диссертационная работа Филюшина Михаила Александровича «Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*» полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции

с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Филошин Михаил Александрович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Официальный оппонент

**Хрусталева Людмила Ивановна**

Главный научный сотрудник Центра

молекулярной биотехнологии

Федерального государственного

бюджетного образовательного

учреждения высшего образования

Российского государственного аграрного

университета – МСХА имени

К.А. Тимирязева,

доктор биологических наук, профессор

Л.И. Хрусталева

21.09.2017

Тел. 8(499) 977-72-01

ludmila.khrustaleva19@gmail.com

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

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

