

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Лебедевой Марины Валерьевны
«Молекулярно-генетические подходы в селекции тополей (*Populus ssp.*)
в условиях Северо-Запада РФ»,
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по
специальности **1.5.7. – «Генетика»**

Диссертационная работа М.В. Лебедевой направлена на исследование возможности применения современных молекулярно-генетических подходов в селекции тополей, произрастающих в климатических условиях Северо-Запада РФ. Тополя являются наиболее востребованной мелколиственной породой в плантационном лесовыращивании, а также составляют основной фонд для озеленения городов в России. Проблема генетической детерминации элитных клонов и/или гибридов тополей стоит особенно остро и является актуальной как для деревообрабатывающей и перерабатывающей промышленности, так и для других отраслей, использующих тополя.

Наша страна за свою историю пережила ряд событий, включая Великую отечественную войну и распад СССР, которые привели к утрате ценных сведений о лесопосадках и озеленении городов и парков. С данной проблемой сталкиваются как крупные хозяйства, имеющие в своем распоряжении сотни и тысячи деревьев в виде плантаций, так и отдельные ботанические сады и исследовательские институты, содержащие дендропарки или отдельные растения в своих коллекциях, сведения о посадке которых безвозвратно утрачены.

Не менее важной проблемой современной действительности является озеленение городов. В настоящее время растительный материал, используемый для озеленения городов, не проходит практически никакого генетического контроля. Достижения молекулярной биологии позволяют осуществлять контроль генотипов, которые идут на озеленение, включая контроль генетического разнообразия и/или элитности используемого материала. Знание о генотипе посадочного материала позволит использовать для озеленения, ветрозащиты, фиторемедиации только те растения, которые обладают всеми необходимыми свойствами для этого и будут максимально эффективно выполнять свою функцию. Кроме того, сведения о свойствах растений, полученные с помощью молекулярно-генетических исследований, позволят более эффективно проводить их районирование и высаживать только в наиболее пригодных местах произрастания для данного конкретного генотипа. Работы, направленные на разработку современных молекулярно-генетических подходов в селекции древесных растений могут послужить

базисом для подготовки нового законодательства в области озеленения городов, а также для формирования плантаций различного назначения, включая питомники элитных генотипов и энергетические плантации для биорефайнинга. Несмотря на бурное развитие технологий секвенирования и относительно небольшой размер гена тополей, полногеномное секвенирование по-прежнему остаётся дорогим и трудоёмким, особенно когда речь идет о скрининге сотен или тысяч образцов.

В связи с вышеизложенным, актуальность и своевременность данной работы не вызывает сомнений, а разработка и применение молекулярных маркеров в селекции тополей остаётся важной задачей современной генетики.

Диссертационная работа Лебедевой М.В. изложена на 123 страницах машинописного текста и включает разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список использованной литературы» и шесть приложений. Диссертация содержит 21 рисунок и 8 таблиц. Библиографический указатель включает 165 источников.

Глава «Обзор литературы» состоит из 7 разделов. В первых разделах представлена общая характеристика рода *Populus* и наиболее часто используемых в плантационном лесовыращивании видов этого рода. Рассмотрены наиболее часто применяемые молекулярные маркеры для идентификации и паспортизации сортов, видов и гибридов тополей. Один из разделов посвящён исследованиям локусов количественных признаков (QTL) для разных видов тополей, а также современным геномным ресурсам доступным для исследования представителей рода. Заключительный раздел посвящён истории и современному состоянию селекции тополей в России.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе подходы и методы: выделение ДНК из растительной ткани, микросателлитный анализ с использованием двух методов детекции – электрофорез в акриламидном геле и капиллярный электрофорез, ISSR-анализ, скрещивание «на срезанных ветках», генотипирование методом RADseq, построение генетической карты, поиск SNP, QTL-анализ, ПЦР в реальном времени.

Глава «Результаты и обсуждения» состоит из 7 разделов. Первый раздел посвящён идентификации клонов тополя невского и ленинградского селекции П.Л. Богданова с помощью микросателлитного анализа. В качестве референсных генотипов использовались гербарные образцы, заложенные непосредственно П.Л. Богдановым в разные годы. В результате было подобрано 6 микросателлитных локуса, анализ которых позволил выявить идентичные клоны в посадках Санкт-Петербурга и Архангельского

СевНИИЛХа. Во втором разделе описано восстановление утерянной схемы посадки клонов осин селекции А.С. Яблокова от разных родительских линий. Так как изучаемые осины являлись триплоидами, это осложняло использование микросателлитных маркеров, поэтому в работе были использованы ISSR-маркеры.

Последующие разделы главы посвящены созданию картирующей популяции осин, полученной от скрещивания «на срезанных ветках». Полученное потомство было высажено в трёх регионах – Ленинградская область, Воронежская область и Сургут. Популяция, выращиваемая в Ленинградской области, была генотипирована с помощью подхода RADseq. Использование данного подхода позволило создать две генетические карты высокой плотности (~1000 SNP для каждой) для обеих родительских особей. С использованием построенных карт был проведён QTL-анализ и выявлен локус, который коррелирует с высотой саженцев в первые два года жизни.

Для SNP, который поддерживает этот QTL-локус, разработан маркер на основе ПЦР в реальном времени, с помощью которого были исследованы гибридные популяции Сургута и Воронежской области. Выяснилось, что высота осин зависит от того, какой вариант, отцовский или материнский, несёт каждое дерево вне зависимости от региона произрастания.

Выводы соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

Полученные результаты опубликованы в 9 печатных работы, из них 3 - в журналах, входящих в перечень ВАК и реферируемых в базе Web of Science и Scopus, 6 – в материалах международных конференций.

С точки зрения фундаментальной науки наибольшим достижением данной работы является создание картирующей популяции осин, полученной от скрещивания в контролируемых условиях и генотипированной с помощью методов высокопроизводительного секвенирования. Полученная популяция позволяет исследовать взаимосвязь генотипа на фенотип растений для самых разных признаков. В рамках работы был выявлен локус на пятой хромосоме, влияющий на рост осин в первые два года. С прикладной точки зрения интерес представляют выявленные и паспортизированные генотипы элитных сортов-клонов тополя невского и тополя ленинградского селекции П.Л. Богданова, которые считались утраченными.

Представленная диссертационная работа Лебедевой М. В. выполнена на современном научном уровне, включает разнообразные подходы и позволила получить новые данные о генетике развития осины европейской.

В целом, можно отметить, что работа хорошо оформлена, материал изложен последовательно и логично, графический материал представлен

наглядно. Методы статистической обработки применены корректно. При обсуждении результатов проведен анализ полученных данных и сопоставление с имеющимися литературными данными.

Вместе с тем, работа не лишена недостатков, и к ней имеется ряд замечаний и вопросов.

1. На мой взгляд, положения, выносимые на защиту, сформулированы не совсем удачно. Они больше похожи на результаты, чем на обобщенный вывод, полученный на основе результатов. Положение № 3 слишком большое и могло бы быть разделено на несколько, кроме того оно содержит пояснения, что не характерно для положения выносимого на защиту. Четвертое положение на защиту могло бы быть сформулировано как «Полиморфизм локуса, выявленного по результатам QTL-анализа, коррелирует со скоростью роста саженцев в первые годы развития».

2. В разделе «Структура и объем диссертации» указано, что диссертация выполнена на 122 страницах машинописного текста, хотя нумерация работы заканчивается на странице 123.

3. В тексте диссертации имеются неоднократные повторы предложений. Так, например, информация о том, что геном *P. trichocarpa* (генотип 'Nisqually-1') стал третьим растительным геномом и первым геномом древесного растения, который был полностью отсекувенирован, повторяется в тексте 3 раза. Другая информация также повторяется от 2-х до 3-х раз по тексту.

4. Довольно необычным и неожиданным фактом является то, что автор забывает использовать курсив для написания латинских названий видов, а также для написания названия генов (стр.14 диссертации, п. 104 списка литературы). Особенно странно выглядит список литературы, в котором наряду с правильным написанием названий видов и рода *Populus*, часто использован обычный шрифт (п. 8, п. 34, п. 38, п. 51, п. 54, п. 55, п. 56, п. 58, п. 59, п. 61, п. 67, п. 70, п. 73, п. 74, п. 76, п. 81, п. 82, п. 87, п. 89, п. 93, п. 98, п. 100, п. 101, п. 102, п. 105, п. 111, п. 112, п. 116, п. 119, п. 120, п. 123, п. 124, п. 127, п. 128, п. 138, п. 139, п. 142, п. 143, п. 145, п. 151, п. 153, п. 154, п. 155, п. 158, п. 161, п. 163, п. 164). К этому же замечанию можно отнести и неполное приведение латинских названий видов (стр. 22, пункт 1.3.2).

5. В тексте диссертации используется сокращение «РВ-ПЦР», по-видимому означающее ПЦР в реальном времени. Это довольно редкое сокращение по отношению к ПЦР в реальном времени, более классическим видится использование кПЦР – количественная ПЦР.

6. Работа содержит пунктуационные ошибки, повторы, опечатки и др. огрехи в оформлении. В частности присутствуют: повторение слов (стр. 15,

первый абзац); пунктуационные ошибки (стр. 30, пункт 1.7., второй абзац, запятая в конце предложения); неправильное использование регистра при написании химических формул (CO₂, п. 115 списка литературы); использование сокращения 'bp' наряду с «пн» и др. К опечаткам также можно отнести ошибку в написании фамилии автора одной из публикаций в списке литературы (Politov et al., 2017).

7. К общим замечаниям по работе можно также отнести и то, что в списке литературы представлено всего 12 работ за последние 5 лет, что составляет менее 10 процентов от всего списка цитируемой литературы. При этом доля публикаций за 2020 и 2021 годы критически мала. Автору следует обратить на это внимание и в будущих работах отводить в обзоре литературы большую долю новым публикациям.

8. На мой взгляд, данные по выживаемости (Рисунок 13) лучше приводить в виде круговой диаграммы с указанием %-ов. Столбчатая диаграмма сложна к восприятию и сложно воспринимается.

9. Возникает ряд методических вопросов к автору. Насколько сохранен и пригоден для столь сложного генетического анализа гербарный материал, особенно довоенного периода? Каково влияние степени деградации ДНК на конечный результат? Каким образом фиксировались листья для выделения ДНК, как контролировалось отсутствие кросс-контаминации образцов при отборе материала? В методике выделения ДНК указано, что слив спирта производили через край пробирки, а это серьезный источник кросс-контаминации образцов, каким образом проводился контроль отсутствия кросс-контаминации образцов при выделении ДНК? Почему ДНК из гербарных образцов выделяли отличным способом, чем ДНК из свежих листьев? Для чего гербарные образцы замораживали в жидком азоте при выделении ДНК, ведь высушенный материал и так прекрасно гомогенизируется на автоматической мельнице?

10. Проводили ли целевое секвенирование по Сэнгеру хотя бы для нескольких образцов, чтобы дополнительно подтвердить полученные результаты?

11. Автор пишет, что «довоенный гербарный экземпляр тополя невского (1938 г.), утраченный в период блокады Ленинграда, генетически отличается от тополей, которые считаются его вегетативным потомством, включая гербарный экземпляр 1966 года». Как автор объясняет данный факт?

12. Какова дальнейшая судьба вновь определенных тополей? Будут ли они размножаться, сохраняться и использоваться для нужд городов и промышленности?

Отмеченные замечания не умаляют ценности проведенного на высоком уровне исследования, носят дискуссионно-рекомендательный характер и могут быть исправлены в ходе последующих исследований автора.

В заключении, хочется подчеркнуть, что диссертационная работа характеризуется глубоким научным содержанием, логичностью и последовательностью изложения материала, наглядностью представления данных, достоверностью и обоснованностью полученных результатов. Анализ работы позволяет судить о том, что автор является сформировавшимся исследователем, способным к планированию, сбору и обработке экспериментального материала, а также к глубокому анализу полученных данных, включая теоретическую и сравнительную работу с опубликованными другими исследователями материалами.

Текст автореферата отражает основное содержание диссертации, а также содержит информацию о новизне полученных данных, степени апробации результатов, теоретической и практической значимости работы.

По степени актуальности, объему проведенной работы, новизне полученных результатов, их теоретическому и практическому значению работа **Лебедевой М.В.** соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени **кандидата биологических наук** по специальности 1.5.7 - «Генетика».

К.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории физиологической генетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Сибирского института
физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской
академии наук (СИФИБР СО РАН)

Подпись Павличенко В.В. заверяю
Ученый секретарь СИФИБР СО РАН



В. В. Павличенко

Т. В. Копытина

6 мая 2022

664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова 132

т. +7-950-111-90-14, e-mail: vpavlichenko@gmail.com