

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Агаханова Магамедгусейна Магамедганифовича «Генетическое разнообразие и селекционная ценность образцов ампелографической коллекции ВИР», представленную к защите в Диссертационный совет Д 006.041.02. при Всероссийском институте генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Актуальность темы. Проблема сбора, сохранения, изучения и стабильного использования генетических ресурсов винограда важна для современной науки, успешного развития промышленного виноградарства, современного общества и будущих поколений. Генетические ресурсы культуры с ценными хозяйственными признаками, использующиеся для производства продуктов питания и создания сырья для промышленности, обеспечивают стабильное развитие и функционирование экологически безопасной сельскохозяйственной отрасли народного хозяйства в условиях постоянных изменений природно-климатических условий и социальных обстоятельств.

Большинство аборигенных и малораспространенных сортов винограда в настоящее время сохранилось только благодаря коллекциям. Древние, так называемые местные сорта и формы, созданные «народной селекцией», характеризуются высокой приспособленностью к условиям возделывания, стойкостью или толерантностью к болезням и вредителям, несут разнообразные и непревзойденные показатели качества продукции. Это свойственно и для сортов винограда, созданных мировой научной селекцией с использованием источников из различных центров происхождения винограда для разных регионов мира, они тоже несут множество ценных генов и признаков, наследственная основа которых служит неисчерпаемым источником исходного материала для создания новых поколений сортов винограда. На сегодняшний день, благодаря применению новых технологий, развитию биотехнологии и биоинженерии, значительно возросла ценность и роль зародышевой плазмы как исходного материала для селекции.

Виноград является одной из экономически важных сельскохозяйственных культур, площадь его возделывания составляет более 7,2 млн. га, а по общему производству, по данным ФАО, виноград занимает третье место среди плодовых культур. В декабре 2019 г. принят Федеральный Закон №468 «О виноградарстве и виноделии в Российской Федерации», направленный на повышение качества продукции виноградарства и продукции виноделия, производство и оборот которых осуществляются на территории Российской Федерации. В этой связи получение высококачественного посадочного материала и создание нового исходного материала с комплексом хозяйственно-ценных признаков является

крайне актуальной и необходимой для выполнения задач дальнейшего развития селекции культуры.

Ампелографическая коллекция ВИР насчитывает 1247 образцов, собранных со всего мира. Её изучение и поддержание открывает возможности выполнения поставленных задач в рамках доктрины обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации и Указа Президента Российской Федерации от 06 февраля 2022 года о создании на базе ВИР Национального центра генетических ресурсов растений, задачей которого является, в том числе, генотипирование образцов, в частности ампелографических коллекций.

Сформулированные цели и задачи настоящей диссертационной работы, направленные на исследования по генотипированию образцов винограда Ампелографической коллекции ВИР, определения перспективности их использования в селекции, исследований получения с использованием культуры тканей *in vitro* оздоровленного от болезней и вредителей посадочного материала, бесспорно, является **актуальным** и соответствует мировому уровню исследований.

Степень обоснованности научных положений, сформулированных в диссертации. Сформулированные диссидентом и выдвинутые на защиту основные положения вполне обоснованы. Используя базу научной литературы по теме исследований (в работе использовано 367 источников, из них 303 на иностранных языках, 7 электронных ресурсов), автором выделены и решены основные задачи и научные положения, отраженные в заключении. Логично, исходя из проанализированных литературных источников, сформулирована цель собственных исследований, заключающаяся в изучении и анализе генетического разнообразия коллекции генетических ресурсов винограда ВИР для последующего использования идентифицированного генофонда в селекции.

В соответствии с этим были четко сформулированы положения, выносимые на защиту:

1. Высокий уровень аллельного разнообразия поддерживаемой в условиях ДОС ВИР коллекции винограда ВИР, выявленный при помощи микросателлитного анализа (PIC варьируется от 0,61 до 0,81), свидетельствует о богатом потенциале коллекции в виде источников генетического разнообразия для селекционных программ.

2. Коллекция винограда ВИР, поддерживаемая в условиях ДОС ВИР, отличается разнообразием потенциальных источников для селекции сортов с разными сроками созревания – от сверхранних до очень поздних.

3. Сорта винограда Кара яй изюм, Виерул-59, Шоколадный, Грочанка, Ливадийский черный, Слава Дербента, Йорк Мадера, Варюшкин, Дунаевски лазур из коллекции ВИР могут использоваться как источники устойчивости к грибным заболеваниям.

Научная новизна материалов диссертационной работы. Экспериментальные исследования, выполненные автором, позволяют

углубить и расширить теоретические знания в области генетики, геномики, селекции и биотехнологии винограда, совершенствовании знаний о геноме винограда, базирующихся на закономерностях формирования биологических и хозяйствственно-ценных особенностей генетически разнородных сортов и форм винограда.

Автором впервые в условиях Северного Кавказа изучено по биологическим признакам большое разнообразие образцов винограда из коллекции ВИР; выявлен образец винограда, показывающий устойчивость к грибным болезням на высоком инфекционном фоне; получена и с помощью микросателлитных маркеров генотипирована серия гибридов от скрещиваний устойчивых к болезням генотипов; выполнено высокопроизводительное секвенирование и предложен первый вариант сборки генома устойчивого к грибным заболеваниям сорта Dixie – образца вида *V. rotundifolia*, оценены по эффективности введения в культуру *in vitro* образцы винограда.

Значимость результатов диссертационной работы для науки и практики. В ходе трехлетних полевых наблюдений были фенотипированы образцы из ампелографической коллекции ВИР по признакам устойчивости к грибным заболеваниям и фенологическим fazam. Выявлен автохтонный сорт винограда Кара яй изюм, выделившийся по признаку очень высокой устойчивости к грибным заболеваниям на высоком инфекционном фоне.

Проведенные скрещивания с этим сортом обеспечили получение генетического материала для дальнейших исследований генетики признака устойчивости к грибным патогенам. Получены перспективные гибриды для использования в селекции.

Данные о генотипической структуре коллекции винограда ВИР востребованы селекционерами при подборе пар для скрещиваний, а полученные гибридные популяции F_1 являются основой для поиска генов-кандидатов хозяйственно ценных признаков, в том числе – устойчивости к болезням.

Важное теоретическое значение имеют представленные в работе результаты секвенирования генома образца вида *V. rotundifolia*. Созданный в ходе исследования и депонированный в биоинформационную базу данных NCBI вариант сборки генома сорта Dixie (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/649974>) служит для исследователей надежным инструментом при идентификации генов устойчивости, а также поиске интрагрессированных фрагментов в геномах удаленных гибридов.

Проведенный анализ генотипов винограда по способности к микроразмножению и культивирования *in vitro* выявил наиболее перспективные образцы для ускоренного микроклонального размножения, и уточнить для них питательные среды.

Актуальность исследований и значимость результатов подтверждается поддержкой работ фондом РФФИ (гранты №№ 19-316-90007, 20-316-80059).

Степень достоверности и апробация результатов исследований.

Материал оригинален; выполнен в соответствии с научными программами и тематическими планами. Результаты, выводы, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы экспериментальными исследованиями, проведенными в лабораторных и полевых условиях; достоверность полученных результатов, выводов обеспечена использованием метода системного анализа полученных данных и подтверждена их статистической обработкой, объемом экспериментов, результатами внедрения. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно. Автор лично осуществлял анализ литературных данных по теме работы, планирование экспериментов, проведение лабораторных исследований, обработку экспериментальных данных, подготовку статей и докладов на конференциях. Полевые опыты проводили совместно с сотрудниками Крымской ОСС и Дагестанской ОС – филиалов ВИР.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на международных и всероссийских конференциях:

VII Съезде ВОГИС, посвященном 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 2019); Международной конференции «Plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology» (Новосибирск, 2019); XIX Всероссийской научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019); 12-ой Международной школе молодых ученых «Системная Биология и Биоинформатика» (Севастополь, 2020); Международной научно-практической конференции «Магарач» (Ялта, 2020); XI международном форуме «Дни сада в Бирюлево: достижения науки в реализации доктрины продовольственной безопасности», (Москва, 2021); III Международном биотехнологическом симпозиуме «БИО-АЗИЯ АЛТАЙ 2021» (Барнаул, 2021); 64-ой Всероссийской научной конференции МФТИ «Биологическая и медицинская физика» (Москва, 2021).

Материалы диссертации в полной мере изложены в работах, опубликованных соискателем ученой степени. По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 5 статей, 2 из которых опубликованы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, а также 9 тезисов.

Оценка содержания диссертационной работы. Диссертационная работа Агаханова М.М. изложена на 160 стр., содержит 23 таблицы, 32 рисунка и 7 приложений, состоит из разделов: введение, обзор литературы (367 наименования, из них 303 на иностранных языках, 7 электронных ресурсов), материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и приложения.

Во введении сформулированы актуальность выбранного направления исследований, основные научные проблемы, цель и задачи исследований, научная новизна и практическое значение полученных результатов.

В первом разделе представлены освещённые в литературных источниках данные о ботанической классификации винограда, генетическом разнообразии образцов винограда в ампелографических коллекциях, в том числе раскрывая историю и современное состояние ампелографической коллекции ВИР. Рассматриваются основные проблемы в виноградарстве в связи с распространением патогенов культуры и актуальные направления поиска генов, определяющих устойчивость к патогенам. Проанализированы современные фундаментальные знания по методологии молекулярных исследований генома винограда и фенотипирования генотипа винограда.

В втором разделе описаны объект и предмет исследований, указаны характеристики места и методов исследования, сортов и форм винограда. Отмечается, что в работе использовались стандартные общепринятые методики и оригинальные, которые были апробированы и доказана правомочность их использования. Для обеспечения достоверности результатов исследований использовали математические и биоинформационные методы. Математическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета статистических программ Statistica 13.0.

В третьем разделе последовательно и обстоятельно представлены результаты исследований и их обсуждение.

В первом подразделе приводятся результаты фенологических исследований. В данном исследовании регистрировали: фенодаты, продолжительности феноинтервалов, сумма активных температур выше 10°C, устойчивость побегов и гроздей к милдью (балл), оидиуму (балл), силу роста (балл). Установлено, что по продолжительности периода от начала распускания почек до полной зрелости ягод – от 96 до 185 сут., представлены сорта всех сроков созревания – от сверхранних до очень поздних. В выборку входили сверхранние сорта с продолжительностью созревания 95-105 дней, очень ранние (105-115 дней), ранние (115-120 дней), ранние-средние (120-125 дней), средние (125-135 дней), средне-поздние (135-145 дней), поздние (более 145 дней). Сумма активных температур выше 10°C варьировала от 2057.8 до 3723°C.

Во втором подразделе представлены данные по оценке устойчивости к болезням. Анализ устойчивости, проявленной образцами за три года, показал, что 93% образцов изученной выборки восприимчивы к поражению милдью и оидиумом в средней и высокой степени, но были обнаружены устойчивые генотипы. В результате оценки выявлены высоко устойчивые к оидиуму листьев образцы (Виерул-59, Шоколадный, Грочанка, Ливадийский черный, Слава Дербента) и сорт, устойчивый к оидиуму гроздей

(Шоколадный). Кроме того, отмечены сорта с высокой степенью устойчивости к милдью листьев (Йорк Мадера, Варюшкин, Шоколадный, Грочанка, Дунавски лазур) и к милдью гроздей (Грочанка, Дунавски лазур).

Установлено, что сила роста не связана с устойчивостью ни к одному патогену. Устойчивость листьев к оидиуму коррелирует с устойчивостью гроздей к оидиуму (0,94), устойчивость листьев к милдью коррелирует с устойчивостью гроздей (0,88). Устойчивость к оидиуму и милдью коррелируют друг с другом с коэффициентами 0,60 ... 0,70.

В третьем подразделе приводятся результаты изучения гибридных популяций. После выделения по признаку «высокая устойчивость к патогенам» автохтонный устойчивый сорт Кара яй изюм был использован в качестве отцовской формы в скрещиваниях с неустойчивыми сортами с женским типом цветка с целью создания гибридных популяций F₁ в качестве нового исходного материала для последующего изучения и использования в селекции. Гибриды от скрещивания винограда Кара яй изюм с восприимчивыми сортами были проанализированы с использованием 10 микросателлитных праймеров. Для 10 проанализированных микросателлитных маркеров было выявлено 93 аллеля. Кроме того, был рассчитан коэффициент информативности PIC для каждого маркера, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах от 0,560 до 0,875. Анализ популяционной структуры по результатам микросателлитного маркирования позволяет сделать вывод о том, что скрещивания 3 (♀ Аг чакракар × ♂ Кара яй изюм), 6 (♀ Махбор цибил × ♂ Кара яй изюм) и 8 (♀ Ири тумут × ♂ Кара яй изюм) не имеют признаков генетического засорения. В перспективе предполагается целесообразным провести скрининг полученных популяций на наличие маркеров из семейства локусов Ren, Rpv для выявления устойчивых форм и включения их в селекционные программы. В настоящее время полученные популяции сохраняется в полевых условиях на Дагестанской опытной станции ВИР.

В четвертом подразделе представлены результаты изучения генетического разнообразия коллекции винограда ВИР. В проведенном исследовании 73 сорта винограда из коллекции ДОС ВИР были проанализированы с использованием восьми микросателлитных праймеров: scu15vv, vvs 2, vvmid 27, vvmid 31, vvih54, vvip31, scu11vv и vvib01, которые были ранее рекомендованы для сортовой идентификации винограда. В общей сложности для восьми проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 111 аллелей. Для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIC, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,61 – 0,81.

Генетическая структура коллекции винограда ДОС ВИР по данным полиморфизма микросателлитных локусов была проанализирована с помощью программы Structure 2.3.4. Выделенные генетические кластеры (K),

демонстрируют генетическое разнообразие образцов винограда. Первая группа объединяет 18 образцов винограда и представляет в основном западноевропейскую эколого-географическую группу сортов винограда (*V. vinifera* convar. *occidentalis* Negr.). Среди них были некоторые известные сорта винограда, такие как Рислинг и Алиготе. Второй кластер включает 28 образцов винограда, которые в основном относятся к восточной эколого-географической группе *V. vinifera* convar. *orientalis* Negr. и представляют собой дагестанские автохтонные сорта винограда. К третьему кластеру были отнесены древние автохтонные сорта винограда бассейна Черного моря (*V. vinifera* convar. *pontica* Negr.).

В пятом подразделе приводятся результаты полногеномного секвенирования *V. rotundifolia* (сорт Dixie). Предложенная автором сборка генома устойчивого к фитопатогенам образца вида *V. rotundifolia* сорта Dixie проанализирована с точки зрения идентификации гомологичных участков с опубликованным геномом культурного винограда *V. vinifera* 12X (International Grape Genome Program, GenBank assembly accession: GCA_000003745.2) и оценки степени сходства геномов двух видов. Особый интерес может представлять выравнивание полученной сборки на хромосому 12 в геноме *V. vinifera*, где ранее был картирован локус RUN1/RPV1, ассоциированный с устойчивостью к оидиуму (RUN1) и милдью (RPV1), а также другие гены устойчивости.

Также, для анализа качества сборки было произведено выравнивание сборки, полученной гибридным методом на доступный геном *V. vinifera* 12X для идентификации участков, которые не совпадают между сборкой у *V. rotundifolia* и *V. vinifera*, имеющих полное соответствие геному *V. vinifera*. Выравнивание было произведено с помощью п.о.bwa-mem, далее выравнивание было конвертировано в участки, представляющие собой интервал на каждой хромосоме (ranges) в среде R. С помощью пакета karyotype R в среде R был визуализирован геном *V. vinifera* 12X и шкалирован на участки длиной 1 миллион п.н. (мегабаз). После этого полученные участки выравнивания гибридной сборки *V. rotundifolia* и *V. vinifera* 12X были сопоставлены с геномом *V. vinifera* 12X.

Известно, что *V. rotundifolia* и *V. vinifera* принадлежат к семейству Vitaceae, содержащее примерно 950 видов и 16 родов. Эти роды дивергировали, что повлекло за собой несколько хромосомных перестроек. Так, *V. vinifera* имеет 19 хромосом ($2n=38$), а *V. rotundifolia* 20 ($2n=40$). Хромосома 7 *V. vinifera* является результатом слияния хромосом 7 и 20 *V. rotundifolia*. Высота пиков означает большее количество регионов в данном месте выравнивания, хромосома 7 сборки *V. rotundifolia* короче хромосомы *V. vinifera* ~ на 6 т. п.н.

В шестом подразделе обсуждаются результаты исследований по влиянию фитогормонов на развитие винограда при его введении в культуру

in vitro. Для аprobации различных условий (состава и концентрации регуляторов роста в питательной среде для инициации роста микрорастений) введения в культуру *in vitro* использовали ранее зарекомендовавшие себя питательные среды из литературных источников, всего 5 вариантов.

Степень приживаемости апикальных меристем при введении в культуру *in vitro* достигала 70 - 95%. У сортов Чол бер, Ахтамар и Джунга (95%, 90%, 85%) отмечен самый высокий уровень приживаемости.

Кроме того, была изучена способность к микроразмножению 10 сортов винограда и отмечены межсортовые различия по уровню коэффициент микроклонального размножения (КМР). Дисперсионный анализ показал, что 10 образцов винограда достоверно различны по уровню КМР ($p<0,000$).

Наибольшим КМР характеризовались образцы Кишмиш мускатный, Рислинг, Чол бер, Серсиаль (КМР 3,4-4,2), достоверно превышавшие по этому показателю образцы Кишмиш Ваткана, Семильон, Баят капы (КМР 2,0-2,1). Влияние группы происхождения на КМР образца было недостоверным.

Таким образом, подобрана питательная среда для ускоренного микроразмножения и получения КМР $\geq 3,1$ 60% изученной выборки образцов винограда. Остальные образцы требуют более индивидуального подбора состава питательной среды для получения высоких показателей микроразмножения.

Замечания по диссертационной работе. Диссертационная работа является законченным научным трудом, достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Вместе с тем, имеются некоторые замечания и пожелания, требующие пояснений, но принципиально не влияющие на общую положительную оценку:

1. В работе встречаются несогласованные предложения, стилистические и орфографические ошибки, текст диссертации недостаточно четко отформатирован (многие страницы не полностью заняты текстом или таблицами, рисунками).

2. В Разделе 1 «Обзор литературы» было бы желательно привести подраздел, в котором было бы описано современное состояние селекции винограда, генотипирования гибридов в популяциях, поскольку в диссертации диссертант проводит такие исследования, а также в конце обзора литературы было бы желательно привести общий вывод, который и обеспечивает формирование целей и задач исследований диссертанта.

3. В Разделе 2, подраздел 2.3 «Оценка образцов коллекции по устойчивости к грибным заболеваниям» необходимо было бы сделать ссылку на литературный источник, в котором описывается применяемая методика.

4. В Разделе 2 необходимо было указать, как проводилась гибридизация – лично диссертантом или нет.

5. В Разделе 3, подраздел 3.1., таблица 11 и далее желательно минимальные, максимальные и средние писать на русском, а не на английском языке, а в последней графе вместо «температура» писать $^{\circ}\text{C}$.

6. В Разделе 3, подраздел 3.2., приложение 6 необходимо было бы более точно разобраться, что такое внутривидовые гибриды, поскольку это может относиться к гибридам в пределах вида *Vitis vinifera* или, к примеру, *Vitis rotundifolia*, и если это гибриды в пределах вида *Vitis vinifera*, то чем отличаются от этих гибридов «европейско-азиатские гибриды»; что предполагает термин «смешанные межвидовые гибриды» и чем эти гибриды отличаются от «межвидовых гибридов».

7. Вероятно в Разделе 3, подраздел 3.2., было бы целесообразно говорить об устойчивости к патогенам коллекционных образцов, откорректировав название подраздела, а все что касается гибридов изучаемых популяций перенести в следующий подраздел 3.3.

8. В подразделе 3.3. исследования были завершены на стадии установления наличия или отсутствия генетического засорения популяций, но в дальнейшем представляло бы интерес приведение морфологического описания гибридов, оказавшихся в других кластерах. Также при подобных исследованиях было желательно сравнивать данные с результатами традиционного гибридологического анализа, в том числе и по признакам устойчивости к отдельным конкретным патогенам.

9. В подразделе 3.5., рисунок 28 не обозначено, какой тип сборки под литерой «а» и под литерой «б».

10. По тексту диссертации, в отдельных подразделах раздела 3 оговаривались возможности рекомендовать результаты исследований для дальнейшего использования, но было бы предпочтительно, чтобы все это было сформулировано в виде «Рекомендаций» для использования в научных исследованиях, образовательном процессе, приведенных после заключения.

Тем не менее, сделанные замечания не относятся к существу проведенных исследований, не снижают научной и практической значимости проведенных теоретических и экспериментальных исследований, не влияют на общую положительную оценку работы и не умаляют ее достоинств.

Заключение. Анализ результатов работы Агаханова М.М., обработка и изложение материалов, показали глубокое творческое мышление и знание методов и методологии научных исследований, используемых для решения поставленных задач. В диссертационной работе представлены законченные научные результаты. Их основное содержание в полной мере отражено в автореферате и опубликованных работах автора.

Полученные экспериментальные данные достоверны, научно обоснованы и подтверждены математической обработкой. Язык и стиль изложения, оформления диссертации и автореферата соответствует работам, подготовленным к защите.

В целом, следует заключить, что представленная диссертация Магамедгусейна Магамедганифовича Агаханова «Генетическое разнообразие и селекционная ценность образцов ампелографической коллекции ВИР», является научно-квалификационной работой, соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК Минобрнауки РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ, № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, и соответствует паспорту специальности 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений, о чем свидетельствуют использованные в работе объекты и методы исследований, научные результаты и выводы.

Автор диссертационной работы Агаханов Магамедгусейн Магамедганифович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Официальный оппонент:

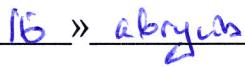
директор

ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач»,

доктор сельскохозяйственных наук по специальности

06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

 Владимир Владимирович Лиховской

 «16 » августа 2022 г.

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач») Россия, 266600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, д. 31

Тел.: +7 988 473 44 88

E-mail: director@magarach-institut.ru

Личную подпись Лиховского В.В. заверяю:

Ученый секретарь

ВНИИВиВ «Магарач»,

кандидат сельскохозяйственных наук

Галкина Е. С.

