

Отзыв официального оппонента Проворова Николая Александровича

на диссертацию Клименко Натальи Станиславовны

“Генетическое разнообразие сортов картофеля отечественной селекции, изученное с использованием различных типов ДНК-маркеров”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность темы

Россия занимает одно из ведущих мест в мире по объемам производства картофеля (*Solanum tuberosum*). Однако отечественные сорта имеют невысокие показатели урожайности, одной из причин которых является недостаточная устойчивость сортов к вредным организмам. Для формирования стратегии работ по селекции картофеля необходимо получение объективной информации о разнообразии генофонда отечественных сортов, в том числе об их генетической защищенности от патогенов и вредителей. За последние десятилетия у картофеля идентифицированы многочисленные гены устойчивости к вредным организмам и разработаны ассоциированные с ними ДНК-маркеры, позволяющие проводить маркер-опосредованный отбор перспективных родительских генотипов для «пирамидирования» генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки. В то же время, многие аспекты генетического контроля устойчивости картофеля к патогенам и вредителям остаются не исследованными, в связи с чем рецензируемая работа является весьма актуальной.

Научная новизна рецензируемой работы не вызывает сомнений, так как автором впервые получены данные о генетическом разнообразии обширной выборки сортов картофеля отечественной селекции с использованием различных типов ДНК-маркеров, определены плазмотипы отечественных сортов картофеля с использованием маркеров митохондриальной и пластидной ДНК, обнаружены сорта с внутригенными маркерами устойчивости к широкому спектру рас *Phytophthora infestans*, проведен молекулярный скрининг отечественных сортов с комплексом маркеров генов/QTLs устойчивости к патотипу Ра3 бледной картофельной нематоды, *Globodera pallida* и выявлен перспективный гаплотип для молекулярного скрининга на устойчивость к ней.

Значимость работы

Полученные результаты имеют несомненную значимость в области молекулярной генетики и биотехнологии, так как автором разработаны новые подходы для создания

сортов картофеля на устойчивость к патогенам и созданы генетические паспорта для проверки идентичности и однородности образцов определенного сорта.

Основное содержание

Рецензируемая диссертация содержит результаты обширного исследования генетического разнообразия отечественных сортов картофеля, выполненное с привлечением коллекции ВИР. Общий объем диссертации 225 страниц, она содержит 47 таблиц и 15 рисунков. Работа состоит из введения, основной части, заключения, списка литературы (430 наименований, из них 332 – на иностранном языке), а также 9 приложений.

Во “Введении” формулируются цели и задачи исследования, показана их актуальность, обоснована научная новизна и практическая значимость работы.

Глава 1 содержит обзор литературы об основных направлениях селекции картофеля на устойчивость к вредным организмам. Эти направления реализовывались с использованием межвидовой гибридизации, которая широко используется для создания сортов картофеля, устойчивых к патогенам. Представлены данные о генетических факторах, вовлеченных в контроль устойчивости к наиболее вредоносным патогенам и выявление ДНК-маркеров, ассоциированных с этими генами. Отдельный раздел обзора посвящен проблеме мужской стерильности сортов картофеля и разработке ДНК-маркеров для детекции разных плазмотипов, интрогрессированных в селекционные сорта от диких видов. Автор достаточно глубоко изучил литературу по тематике диссертации и свободно владеет информацией по современному состоянию проблемы.

Глава 2 посвящена описанию материала и методов исследований. Приводятся характеристики растительного материала - 214 отечественных сортов, созданных в 46 селекционных учреждениях. Основным методом исследования был ПЦР-анализ, дано детальное описание использованных методик проведения молекулярного скрининга с ДНК-маркерами, ассоциированными с 14 генами и QTLs, контролирующими устойчивость к разным вредным организмам, а также с ДНК-маркерами разных плазмотипов. Приведена методика генотипирования с использованием хромосомспецифичных монолокусных SSR-маркеров. Все маркеры были отобраны на основе анализа литературных источников, они активно используются в генбанках разных стран и в селекционных центрах для изучения разнообразия сохраняемых сортовых коллекций, а также для отбора ценных генотипов.

Глава 3 посвящена результатам исследований и их обсуждению.

В разделе 3.1 с использованием маркеров пластидных и митохондриальных геномов изучаемая выборка была охарактеризована по плазмотипам. Выявлено ограниченное генетическое разнообразие отечественных сортов, у которых идентифицированы только

три типа - Т (чилийский), D, γ из восьми известных по литературе для мирового сортового генофонда. Автор провел оценку фертильности пыльцы сортов с идентифицированными плазмотипами и показал значимую корреляцию мужской стерильности только с γ-типом. Анализ родословных изученных сортов показал, что этот плазмотип характерен для отечественных сортов, созданных на основе гибридов с диким мексиканским видом *Solanum stoloniferum*, который вовлекался в межвидовую гибридизацию с целью интрогрессии ядерных генов устойчивости к вирусам и к фитофторе. Среди отечественных сортов с D-плазмотипом, переданным от другого мексиканского вида - *S. demissum*, автор выявил и генотипы с мужской фертильностью, которые могут использоваться в скрещиваниях.

Идентификация разных плазмотипов у сортов отечественной селекции проведена впервые, этот аспект работы имеет важное практическое значение, так как информация о мужской стерильности/фертильности определенных сортов, позволит селекционерам отбирать материнские и отцовские формы для проведения эффективных скрещиваний с целью «пирамидирования» генов устойчивости.

Во разделе 3.2 автор приводит результаты молекулярного скрининга отечественных сортов картофеля с маркерами генов *H1* и *Grol-4*, контролирующих устойчивость к объекту внутреннего карантина – *Globodera rostochiensis* - золотистой цистообразующей картофельной нематоды (ЗКН). Проведен скрининг сортов с семью известными из литературы ДНК-маркерами генов *H1* и *Grol-4* и сопоставление полученных результатов с данными фитопатологических тестов Госсортоиспытаний на устойчивость к ЗКН этих сортов. В результате были отобраны два ДНК-маркера гена *H1* с высоким уровнем диагностической эффективности (более 90%), которые были детектированы у трети изученной выборки; среди современных российских сортов частота сортов с диагностическими фрагментами этих маркеров несколько выше. Тот же подход использован в отношении другого патотипа золотистой нематоды – Ro5, однако корреляции между наличием/отсутствием ДНК-маркеров QTL локуса *Grp1* и устойчивостью сортов в этом случае не было выявлено.

В разделе 3.3 представлены данные молекулярного скрининга сортов с ДНК-маркерами, ассоциированными с 5 локусами, контролирующими устойчивость к бледной картофельной нематоды (БКН) - *Globodera pallida*. Маркер гена *Gpa2*, имеющий по литературным данным наибольший эффект на проявление признака устойчивости, детектирован у 14% изученных сортов. Сопоставление полученных результатов с данными фитопатологических тестов не выявило значимой ассоциации с устойчивостью к БКН. Использование большего числа ДНК-маркеров, ассоциированных с пятью QTL,

вовлеченными в контроль устойчивости к *G. pallida*, позволило автору выявить перспективный гаплотип для проведения дальнейшего молекулярного скрининга на устойчивость к БКН. Однако эти данные можно считать предварительными, поскольку они получены для небольшой выборки.

Согласно данным литературы, устойчивость к цистообразующим картофельным нематодам была передана селекционным сортам от образцов андийского культурного подвида (*S. tuberosum* ssp. *andigenum*). Поскольку автор выявил целый ряд сортов с ДНК-маркерами нематодоустойчивости андийских форм, но не обнаружил у них андийский плазмотип, сделано заключение о том, что в селекции нематодоустойчивые образцы *S. tuberosum* ssp. *andigenum* участвовали в качестве опылителей.

Таким образом, результаты проведенных исследований (разделы 3.2 и 3.3) демонстрируют низкий уровень защищенности отечественных сортов по отношению к цистообразующим нематодам. В то же время, полученные результаты подтвердили перспективы использования в селекционных программах методов молекулярного скрининга для отбора генотипов, устойчивых к *G. rostochiensis* и *G. pallida*.

В следующих четырех разделах (3.3 - 3.6) анализируются результаты молекулярного скрининга отечественных сортов картофеля с маркерами генов *Rysto/Ry-fsto*, контролирующих устойчивость к Y вирусу картофеля (PVY), и с маркерами генов *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1*, *R1* и *R3a*, вовлеченных в контроль разных типов устойчивости к фитофторе, которые были интродуцированы в селекционный генофонд от диких мексиканских видов картофеля *Solanum stoloniferum* и *S. demissum*.

Маркеры генов *Rysto/Ry-fsto* были выявлены лишь у 15 из 205 (7%) сортов, которые создавались, начиная с 1980-х годов, когда в отечественную селекцию стали вовлекаться устойчивые к PVY образцы мексиканского вида *S. stoloniferum*, относящегося к вторичному генпулу картофеля. Показано, что все отечественные сорта с этими ДНК-маркерами обладают плазмотипом γ , обуславливающим мужскую стерильность.

Диагностические компоненты маркеров генов *R1* и/или *R3a*, контролирующих расоспецифическую устойчивость к фитофторе, детектированы у более чем 70% изученных сортов с разными плазмотипами. В то же время, среди сортов с D-типом, интродуцированным от *S. demissum* выявлены и сорта с мужской фертильностью. Эти результаты имеют важное значение при выборе генотипов для скрещиваний, направленных на пирамидирование генов устойчивости к разным патогенам.

Поскольку методы маркер-опосредованной селекции все шире используются в отечественных селекционно-генетических программах, автор провел детальный анализ имеющихся в литературе данных о наличии диагностических фрагментов ДНК-маркеров

R-генов у разных образцов одного и того же сорта (раздел 3.7). Эти несовпадения указывают на необходимость создания молекулярно-генетических паспортов сортов.

В этом плане важным является последний раздел (3.8) диссертационной работы, в котором представлены результаты создания таких «эталонных» образцов – созданы номенклатурных стандартов 21 сорта картофеля селекции Ленинградского НИИСХ «Белогорка», и разработаны их генетические паспорта. В них представлен аллельный состав десяти хромосомспецифичных микросателлитных (SSR) локусов, а также важные для селекционеров данные о маркерах генов устойчивости и плазмотипах сортов.

Заключение скомпоновано в форме 8 основных тезисов - выводов, каждый из которых предварительно был обоснован в соответствующей главе. Все эти выводы подтверждены экспериментальными данными. Поставленные автором задачи и цели, без сомнения, достигнуты.

Несомненным плюсом работы является наличие раздела “Дальнейшее развитие диссертационного исследования”. В то же время, при подведении общих итогов работы желательно обратить большее внимание на фундаментальные аспекты полученных результатов. Например, хотелось бы узнать, что нового мы узнали о генетической организации *Solanum tuberosum* не только как сельскохозяйственной культуры, но и как ботанического вида (организация генома, генетический контроль основных морфологических и физиологических признаков, филогения и эволюция рода *Solanum* и т.д.).

У оппонента имеются ряд конкретных вопросов и замечаний. Например, неясно на каком основании были выбраны 10 nSSR-маркеров для разработки молекулярно-генетических паспортов сортов? Некоторые гены/QTL, контролирующие устойчивость к различным патогенам и вредителям, локализованы в одной и той же хромосоме (таблица 21 диссертации, таблица 1 автореферата). Что известно о сцеплении этих генов? В случае их тесного сцепления - каковы результаты или перспективы вовлечения ДНК-маркеров, использованных в диссертационной работе, в практической селекции на групповую и комплексную устойчивость сортов картофеля?

Также у оппонента возникли редакционные замечания. Например, не указано какие показатели варьирования представлены в виде “усиков” на рис. 1 и 2 автореферата (стандартные ошибки, дисперсии, доверительные интервалы). Говоря о низком уровне генетического разнообразия сортов картофеля по плазмотипам (1-е положение, выносимое на защиту), а также о низкой защищенности этих сортов от золотистой нематоды (2-е положение) необходимо указать, с чем сравнивали эти уровни. Обсуждая результаты

генотипирования сортов по маркерам пластид и митохондрий, лучше говорить не о “типах цитоплазмы”, а о “плазмотипах”.

Содержание и структура диссертации адекватно отражены в автореферате. Список публикаций по теме диссертации насчитывает 10 наименований, из них 6 статей опубликованы в изданиях, рекомендованных ВАК, две - на английском языке и 7 – в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus.

Заключение

Представленное в диссертации Н.С. Клименко исследование выполнено на высоком научно-методическом уровне и соответствует современным мировым стандартам в области молекулярной генетики. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Сделанные замечания носят редакционный и рекомендательный характер, они касаются формы представления результатов, не затрагивая сути основных положений диссертации. Полученные автором экспериментальные данные представлены в виде научных статей в рецензируемых журналах перечня ВАК.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Клименко Натальи Станиславовны “Генетическое разнообразие сортов картофеля отечественной селекции, изученное с использованием различных типов ДНК-маркеров” полностью соответствует критериям пп. 9-14 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 г.) и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, доктор биологических наук по специальности 03.00.15 – Генетика

Николай Александрович Проворов. 196608, С.-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3, +7-812-470-51-00, provorovnik@yandex.ru

Подпись Н.А. Проворова верна. Нач. отдела кадров ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии М.А. Ковалевская

“23” августа 2022 г.

