

УТВЕРЖДАЮ

**Проректор по молодежной политике
и общим вопросам**

Р.А.Кутуев



Отзыв

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

Актуальность исследований

Важным фактором развития селекционной работы любой сельскохозяйственной культуры является создание и изучение исходного материала. Именно исходный материал является залогом выведения новых конкурентноспособных сортов. Виноград (*Vitis*) является древней сельскохозяйственной культурой, имеющей важное значение в истории агропромышленности. На сегодняшний день известно около 79 видов винограда, включающих в себя как культурные, так и дикорастущие вариации. В настоящее время ампелографическая коллекция ВИР насчитывает 1247 образцов, собранных со всего мира (Кислин и др., 2015). Ее изучение и поддержание открывает возможности выполнения в рамках доктрины обеспечения продовольственной безопасности РФ (Указ Президента РФ от 21 января 2020 г. №20).

Известно, что виноград поражают более 80 фитопатогенов (Porotikova et al., 2021), включая грибы, вирусы и бактерии (Pearson, Goheen, 1988; Carisse, 2016; Calonnec et al., 2016; Лиховской, 2018). Наибольшие потери урожая вызывают милдью (ложная мучнистая роса, возбудитель *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni.) – до 100 % и оидиум (мучнистая роса, возбудитель *Uncinula necator* Burill.) – до 65 % (Thind et al., 2014). Поэтому современная селекция ставит задачи по поиску и подбору генотипов, для получения высококачественного посадочного материала и создание нового исходного материала с комплексом хозяйственно-ценных признаков. В связи с чем, актуальность темы диссертационной работы автора не вызывает сомнений.

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

Научная новизна.

В работе Агаханова Магамедгусейна Магамедганифовича впервые в условиях Северного Кавказа изучено по биологическим признакам большое разнообразие образцов винограда из коллекции ВИР; выявлен образец с источником устойчивости к грибным заболеваниям высоких инфекционных фонах; получена гибридная популяция и с помощью микросателлитных маркеров генотипирована серия гибридов от скрещиваний устойчивых к болезням генотипов; впервые выполнено высокопроизводительное секвенирование и предложен первый вариант сборки генома устойчивого к грибным заболеваниям сорта 'Dixie' – представителя вида *V. rotundifolia*, высокопроизводительное секвенирование и предложен первый вариант сборки генома устойчивого к грибным заболеваниям сорта 'Dixie' – представителя вида *V. rotundifolia*.

Достоверность результатов исследований и обоснованность научных положений.

Достоверность результатов исследований подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, представленного в диссертационной работе и статьях. Обоснованность и достоверность результатов исследований, отраженных в диссертации, обеспечена высоким уровнем теоретического и методического обоснования с использованием научных трудов ведущих отечественных и зарубежных ученых в области молекулярной биологии, генетики, селекции винограда. Достоверность опытов подтверждается математической и статистической обработкой данных. Все научные положения, выводы и рекомендации, приведенные в диссертации, обоснованы. Основные результаты, изложенные в диссертации, получены автором самостоятельно. Автор лично осуществил анализ литературных данных, планирование экспериментов, проведение лабораторных исследований, обработку экспериментальных данных, подготовку статей и докладов.

Полученные результаты прошли апробацию путем публикаций в печати, в том числе в двух изданиях рекомендованных ВАК РФ и доложены 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).

обсуждение, заключение и приложения. Иллюстративный материал содержит 23 таблицы, 32 рисунка и 7 приложений.

Во введении автор подводит к сути проблемы и формулирует цель и задачи. Обзор главы, глава один, написан довольно кратко и не содержит лишней информации. **В обзоре** приведены сведения о ботанических особенностях винограда, генетическом разнообразии ампелографической коллекции ВИР, о наиболее распространенных болезнях винограда и вредителях; современных методах изучения генетического разнообразия и полногеномного анализа, а также данные о создании дублетных *in vitro* коллекций.

Во второй главе приведены исходный материал и методы исследований, классические полевые (фенологические наблюдения, фитопатологическая оценка, проведение скрещиваний), лабораторные (выделение ДНК, постановка ПЦР, проведение электрофореза в агарозном геле, анализ амплифицированных фрагментов, подготовка библиотек для секвенирования и загрузка библиотеки в проточную ячейку, биотехнологические – введение в культуру *in vitro*, стерилизация апексов и черенкование) и статистические.

Третья глава приведены результаты исследований, которая включает шесть подразделов, посвященных анализу генетического разнообразия и селекционной ценности образцов ампелографической коллекции ВИР.

В первом подразделе соискателем приведены данные фенологических наблюдений с 2018-2020 гг. Согласно международному классификатору OIV (1983), по продолжительности периода от начала распускания почек до полной зрелости ягод –от 96 до 185 суток, в коллекции представлены сорта всех сроков созревания – от сверхранних до очень поздних. Сумма активных температур (в течение всего периода вегетации) выше 10°C варьировала от 2057 до 3723°C.

Во втором подразделе автором приведен анализ устойчивости ампелографической коллекции ДОС ВИР и оценка гибридной популяции. Образцы были изучены по таким показателям, как устойчивость к милдью (листьев/гроздей) и оидиуму (листьев/гроздей). Анализ устойчивости за три года, показал, что 93% образцов изученной выборки восприимчивы к поражению милдью и оидиумом в средней и высокой степени, также выявлены образцы с устойчивостью к этим патогенам. 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', 'Дунаевски лазур') и к милдью гроздей ('Грочанка', 'Дунаевски лазур').

В третьем подразделе диссертантом представлены результаты изучения и описания гибридных популяций. Гибриды от скрещивания винограда 'Кара яй изюм' с восприимчивыми сортами были проанализированы с использованием 10 микросателлитных праймеров. В результате анализа 10 проанализированных микросателлитных локусов у изученных гибридов было выявлено

93 аллеля (от 6 до 11 на локус). Кроме того, был рассчитан коэффициент информативности PIC для каждого маркера, значения которого варьировали в диапазоне 0.560–0.875.

Генетическая структура популяции была проанализирована в программе Structure 2.3.4 и показали, что изученные гибриды могут быть отнесены к восьми группам. Анализ популяционной структуры по результатам микросателлитного маркирования позволяет сделать вывод о том, что гибриды от 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 и потенциально могут быть использованы для селекционных целей.

В четвертом подразделе соискателем приведены результаты генетического разнообразия ампелографической коллекции ВИР. Выборка состоялась из 73 образцов винограда из коллекции ДООС ВИР и была проанализирована с использованием восьми микросателлитных праймеров: SCU 15VV, SCU 11VV, VVMD 27, VVMD 31, VVIN 54, VVIP 31, VVIB 01, VVS 2. Для восьми проанализированных микросателлитных локусов было выявлено 111 аллеля. Кроме того, для каждого маркера был рассчитан коэффициент информативности PIC, значения которого были достаточно высоки и варьировали в пределах 0,61–0,81. Среди них были некоторые известные сорта винограда, такие как ‘Рислинг’ и ‘Алиготе’. Второй (зеленый) кластер включает 28 образцов винограда, которые в основном относятся к восточной экологогеографической группе *V. vinifera* convar. *orientalis* Negr. и представляют собой дагестанские автохтонные сорта винограда. К третьему (синему) кластеру были отнесены древние автохтонные сорта винограда бассейна Черного моря (*V. vinifera* convar. *pontica* Negr.) и некоторые внутривидовые гибриды. В четвертую группу (желтую) вошли европейско-азиатские, внутривидовые, смешанно-комплексно устойчивые и межвидовые гибриды.

В пятом подразделе автором представлены результаты высокопроизводительного секвенирования *V. rotundifolia* (сорт ‘Dixie’). Для секвенирования двух библиотек геномной ДНК, выделенной из листьев *V. rotundifolia* (сорт ‘Dixie’), были использованы две проточные ячейки MinION (тип R9.4.1). Перед загрузкой в ячейку первая библиотека содержала 1008 нг ДНК (с концентрацией 84 нг/мкл), вторая библиотека – 1152 нг (96 нг/мкл). Время работы одной ячейки в среднем составило 48 ч. Всего с двух ячеек было получено 1 748 466 прочтений (далее – ридов). После декодирования сырого сигнала fast5 в fastq/fastx и коррекции ошибок с помощью guppy было получено 1 738 535 ридов. Для полученных ридов был произведен контроль качества с помощью ruqC, получены такие статистические показатели, как количество ридов, количество оснований, N50, медианы длин и качества ридов. Показатель N50 (минимальная длина, которую имели более половины полученных ридов) по результатам запуска первой ячейки составил 7310 пн, второй – 14600 пн. Медианы длин ридов составили 3500 пн для первой ячейки и 6380 пн – для второй.

Научные положения, выводы, рекомендации производству и селекционной практике обоснованы квалифицированным аналитическим образом научной литературы, экспериментальным материалом.

Научные 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.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в том, что определены закономерности фенотипической изменчивости всех разновидностей вида *Vitis* и их сортоотипов. Выявлен автохтонный образец 'Кара яй изюм', выделившийся по признаку абсолютной устойчивости к грибным заболеваниям. В результате скрещиваний с этим образцом создан растительный материал для дальнейших исследований генетики признака. Получены перспективные гибриды для использования в селекции.

Получены данные, о генотипической структуре коллекции винограда ВИР востребованы селекционерами при подборе пар для скрещиваний. Данные полученные автором о гибридной популяции F1 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 биоинформатическую базу данных NCBI вариант сборки генома образца 'Dixie' (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/649974>) служит для исследователей надежным инструментом при идентификации генов устойчивости, а также поиске интрогрессированных фрагментов в геномах отдаленных гибридов.

Проведенный анализ генотипов винограда по способности к микроразмножению и культивирования *in vitro* выявил наиболее перспективные образцы для ускоренного микрочлонального размножения.

Структура и содержание диссертационной работы.

Диссертация работа Агаханова Магамедгусейна Магамедганифович изложена на 160 страницах и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и

В шестом подразделе соискателем приводятся результаты культивирования в стерильных условиях (введение в культуру *in vitro*, микроразмножение, укоренение) 10 сортов винограда (табл. 23) в трех повторностях на питательной среде МС (Murashige, Scoog, 1962) с добавлением 1 мг/л 6-БАП. Степень приживаемости апикальных меристем при введении в культуру *in vitro* на питательной среде МС + 1мг/л БАП достигала 70 – 95%. Сорта ‘Чол бер’, ‘Ахтамар’ и ‘Джунга’ (95%, 90%, 85%) показали самый высокий уровень приживаемости. Проведены измерения высоты микрорастений винограда. По морфогенетическому потенциалу наибольший размер (в см) на 30 сутки отмечали у сортов ‘Кишмиш мускатный’ (4,1±0,6), ‘Чол бер’ (3,9±1,2), ‘Рислинг’ (3,8±0,8).

Замечания и пожелания к работе:

1. В работе встречается стилистические, орфографические ошибки и несогласованные предложения.
2. На рисунке 15 говорится о неустойчивых сортах с ФЖТ цветка, однако представлен только один сорт и то без названия
3. На рисунке 31 не указано в каких единицах измерения вычисляется высота растений.
4. Неправильно написаны названия сортов – Алзуб, Аг чакрак, Гок ала, Дунаевски лазур, Серсиль
5. Не до конца раскрыта в диссертации задача №6 «Анализ образцов винограда по эффективности введения в культуру *in vitro* и микроразмножения». Для размножения винограда используют модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга, однако об этом нету данных в работе. Нет информации каким способом проводили стерилизацию меристем.
6. В шестом выводе говорится о том, что «установлено достоверное влияние генотипа на коэффициент микрклонального размножения», однако это не совсем так. В таблице 23 говорится о коэффициенте размножения, а представлены данные по количеству растений (введенных в культуру *in vitro*, инфицированных эксплантов и т.д.)

Однако, эти замечания не снижают ценность диссертационной работы: работа интересная и масштабная, много новой информации и имеет теоретическое и практическое значение.

Заключение

Считаем, что диссертационная работа «**Генетическое разнообразие и селекционная ценность образцов ампелографической коллекции ВИР**», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук отвечает требованиям пунктов 9-11, 13, 14. Положения Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 482 «О порядке присуждения ученых степеней (с изменениями на 01 октября 2018 года), а ее автор **Агаханов Магамедгусейн**

Магамедганифович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности **06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных культур**.

Отзыв на диссертационную работу Агаханова Магамедгусейна Магамедганифовича подготовлен кандидатом биологических наук Палаевой Д.О. и доктором сельскохозяйственных наук Батукаевым А.А., обсужден и утвержден на заседании кафедры плодовоощеводства и виноградарства 22 августа 2022 года (Протокол №7).

Отзыв подготовили:

Палаева Диана Омаровна
кандидат биологических наук, доцент
(03.02.14 – биологические ресурсы, 2013г.)
заведующий кафедрой плодовоощеводства и виноградарства
Агротехнологического института
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова»



Handwritten signature of D. O. Palaeva

Батукаев Абдулмалик Абдулхамидович,
доктор с.-х. наук (06.01.08- пловодство, виноградарство, 1999г.),
профессор, профессор кафедры плодовоощеводства и виноградарства,
Почетный работник науки и высоких технологий РФ

Handwritten signature of A. A. Batukaev

Почтовый адрес:

364024, г. Грозный, ул. Шерипова, 32
Агротехнологический институт,
ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет им.А.А.Кадырова»
Тел.+7(8712)29-00-04 / +7(928)736-58-01
E-mail: mail@chesu.ru / batukaevmalik@mail.ru

22.08.2022.

