

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова
чл.-корр. РАН

А.М. Кудрявцев

31 марта 2023 г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук на диссертационную работу РОЗАНОВОЙ Ирины Вениаминовны на тему: «ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ЯЧМЕНЯ К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7– «Генетика» в диссертационный совет 24.1.239.01, созданный на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН».

Актуальность исследования

Одомашненный ячмень (*Hordeum vulgare L.*) является одной из важнейших злаковых культур которая помимо важного продовольственного и кормового назначения служит сырьем для огромного сектора современной экономики – пивоваренной промышленности. В процессе его доместикации отбирались формы, наиболее полно обеспечивающие человека надежными источниками питания и обладающие рядом важных хозяйственных признаков, таких как ломкоколосость и синхронность прорастания семян. В тоже время в настоящее время все сорта ячменя, зарегистрированные в Государственном реестре селекционных достижений, в той или иной степени восприимчивы к сетчатой и темно-бурой пятнистостям, вызываемых гембиотрофными патогенами, такими как *Cochliobolus sativus* Drechs. Ex Dastur (возбудитель темно-бурой пятнистости и корневой гнили) и *Pyrenophora teres* f. *teres* Drechsler (возбудитель сетчатой пятнистости), которые распространены повсеместно в ареале возделывания ячменя. Ежегодные потери от данных заболеваний в неблагоприятные годы могут достигать 40-45 %. Поскольку современное растениеводство, в том числе и в России, ориентировано на ресурсосберегающие и экологически безопасные технологии, то устойчивость новых сортов к распространённым

патогенам и болезням становится одним из важных показателей конкурентоспособности таких сортов.

Исследование Розановой Ирины Вениаминовны является весьма весомым вкладом в идентификацию и молекулярное маркирование геномных локусов, ассоциированных с устойчивостью ячменя к грибным болезням, вызываемых *Cochliobolus sativus* Drechs. Ex Dastur (возбудитель темно-бурой пятнистости и корневой гнили) и *Pyrenophora teres* f. *teres* Drechsler (возбудитель сетчатой пятнистости).

Научная новизна

Розанова Ирина Вениаминовна с использованием SNP-чипа «Barley 50 K Illumina Infinium iSELECT» провела генотипирование сортов ячменя и с помощью анализа ассоциации «генотип-фенотип» выявила 12 геномных локусов, значимо ассоциированных с устойчивостью сибирских сортов ячменя к темно-бурой и сетчатой пятнистостям. Геномные локусы, ассоциированные с устойчивостью ячменя к темно-бурой и сетчатой пятнистостям, были маркированы диагностическими ПЦР-маркерами, подтвержденными на независимых выборках образцов ячменя.

Практическая и теоретическая значимость работы

Полученные при выполнении работе знания о выявленных геномных локусах, ассоциированных с устойчивостью к грибным болезням, могут быть использованы для дальнейшего установления молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости ячменя к темно-бурой и сетчатой пятнистостям, может быть использовано для улучшения ярового ячменя по признакам устойчивости. Разработанные в данной работе диагностические ПЦР-маркеры, могут быть использованы для ускоренного, экономичного и эффективного отбора устойчивых форм среди селекционного материала.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Розановой Ирины Вениаминовны на тему: «ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ЯЧМЕНЯ К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ» выполнена на 201 странице, иллюстрирована 27 рисунками и содержит 23 таблицы, а также 6 таблиц в приложении. Библиографический указатель состоит из 287 источников. Работа построена по традиционной схеме с состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, выводов, списка цитируемой литературы и приложения.

В разделе «Введение» автором описана основная проблематика исследования, обоснована актуальность проводимых исследований, сформулированы цель и задачи. Также отражено личное участие автора и приведена информация о публикациях и апробации работы.

«Обзор литературы» является компетентным введением в экспериментальную часть. В нем детально рассмотрена история доместикации и традиционной селекции ячменя, показаны новые подходы в селекции ячменя, возникшие с развитием молекулярной генетики, а также в постгеномный период, обсуждены различные механизмы устойчивости растений к фитопатогенам, в том числе вызывающих темно-бурую и сетчатые пятнистости, а также вызывающие корневые гнили. Обзор написан достаточно хорошим языком и оформлен иллюстративным материалом.

В разделе «Материалы и методы» диссертант с исчерпывающей полнотой описывает методы, использованные при выполнении данной работы. Эта внушительная методическая часть характеризует автора как зрелого исследователя, способного эффективно использовать большой арсенал современных молекулярно-генетических, инструментальных и теоретических методов. Использованные автором методы современны и адекватны поставленным задачам.

Структура разделов «Результаты» и «Обсуждение» соответствует задачам, поставленным для достижения главной цели исследования. Раздел «Результаты» включает шесть подразделов. В пяти представлены результаты генотипирования сортообразцов ячменя и анализ полученных данных от характеристики популяционной структуры изучаемой выборки до выявления локусов устойчивости ячменя к возбудителям корневых гнилей, а также сетчатой и темно-бурой пятнистости. Шестой подраздел посвящен разработке и валидации диагностических ПЦР-маркеров. В разделе «Обсуждение» диссертант анализирует полученные результаты в контексте известных к настоящему моменту мировых данных об устойчивости растений ячменя к патогенам, вызывающих темно-бурую и сетчатые пятнистости, а также корневые гнили.

В «Заключении» подводятся итоги работы. Представленные выводы диссертации и основные положения, выносимые на защиту, обоснованы, логичны, соответствуют поставленным задачам, в полной мере отражают результат диссертационной работы.

Замечания

Однако к диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. Диссертационная работа построена по традиционному для такого типа работ принципу – проводится генотипирование выборки растений, фенотипированных по признаку их устойчивости к заболеванию, после чего с помощью анализа

ассоциации «генотип-фенотип» выявляются локусы устойчивости к патогенам. Такую работу могло бы улучшить более детальное обсуждение генов, расположенных в этих локусах, их возможных функций в целом и в контексте механизмов устойчивости к патогену.

2. В ходе работы автор разработал и валидировал ряд диагностических ПЦР-маркеров. При этом, что правильно, была рассчитана диагностическая эффективность разработанных маркеров. Однако это не единственная характеристика разрабатываемых тест-систем, которая должна быть получена и отражена в работе. В частности, для тест-систем необходимо приводить характеристики точности (доля истинно положительных и отрицательных результатов к общему числу исследований), чувствительности (отношение истинно положительных результатов к сумме истинно положительных и ложно отрицательных результатов) и специфичности (отношение истинно отрицательных результатов к сумме истинно отрицательных и ложно положительных результатов). Более того, такие характеристики выявленных диагностических SNP было бы целесообразно рассчитать на основе данных, полученных при генотипировании на микрочипах.
3. На странице 76 сказано, что «ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл... в режиме:... полимеризация – 45 секунд при 72°C;». Использование для амплификации продукта размером 200 п.н. стадии элонгации в 45 секунд представляется сильно избыточным и программу амплификации следует в будущем оптимизировать. Если речь идет об анализе сотни другой образцов, то конечно это не имеет особого смысла, но в данном случае разрабатываются аллель-специфичный ПЦР-маркер, которые предполагается использовать в селекционном процессе, что означает возможный анализ десятков тысяч образцов. Таким образом оптимизация протокола амплификации позволит едва ли не вдвое увеличить производительность использующей данную методику лаборатории.
4. На стр. 115 сказано, что «Наличие фрагмента ДНК, длиной ~200 пн указывает на присутствие аллеля А в геноме сорта ячменя, тогда как отсутствие фрагмента ДНК на электрофореze указывает на присутствие альтернативного аллеля С». Строго говоря, такого рода тест-системы обязательно должны содержать контроль амплификации или, что лучше, амплификацию альтернативного аллеля. Иначе высока вероятность получения ложных результатов из-за ингибирования по тем или иным причинам реакции амплификации.

5. В работе имеется некоторое количество опечаток. Например, на странице 78 сказано, что «При размере генома ячменя $5,1 \cdot 10^9$ пн в среднем приходится один маркер на 186 пн.». Очевидно, что должно быть 186 т.п.н. Вроде бы и одна буква пропущена, а с другой стороны ошибка на 3 порядка. На стр. 115 должна быть ссылка на рисунок 26, а не 27.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки представленной работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации соответствует установленным требованиям и отражает основные результаты проведенных исследований. В автореферате отражены актуальность исследования, степень разработанности темы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, и полученные результаты.

Сведения о полноте опубликованных работ

Результаты исследования полностью представлены в 5 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для соискателей ученой степени кандидата биологических наук. В опубликованных научных работах и автореферате полностью отражены основные результаты диссертации, положения и выводы.

Заключение

Диссертационная работа Розановой Ирины Вениаминовны на тему: «ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ЯЧМЕНЯ К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора РАН, Хлесткиной Елены Константиновны, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для генетики растений. Таким образом, диссертационная работа Розановой И.В. на тему: «ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ ЯЧМЕНЯ К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ», соответствует требованиям пп. 9 - 14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 в редакции с изменениями от 28.08.2017 г. №1024, 01.10.2018 №1168 и

от 11.09.2021 №1539 предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – «Генетика».

Отзыв ведущей организации рассмотрен на заседании Отдела генной инженерии и синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (протокол №7 от 31 марта 2023 г.).

Отзыв подготовил:

заведующий лабораторией функциональной геномики

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук,

кандидат биологических наук по специальности

03.01.03 – молекулярная биология, доцент



С.А. Брускин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им.

Н.И. Вавилова Российской академии наук

119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д.3

Сайт www.vigg.ru

Тел.: (499) 135-62-13, Факс: (499) 132-89-62

Email: iogen@vigg.ru

Подпись Брускина С.А. заверяю,

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова,

д.б.н.

«31» марта 2023 г.



И.И. Горячева