

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА ДИССЕРТАЦИЮ МАКУХА ЮЛИИ АЛЕКСАНДРОВНЫ ПО ТЕМЕ «МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ *BRASSICA OLERACEA* L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОСУДИСТому БАКТЕРИОЗУ И ФУЗАРИОЗУ», ПРЕДСТАВЛЕННУЮ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 4.1.2. СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Диссертационная работа Макуха Ю.А., посвященная поиску молекулярных маркеров ассоциированных с признаками устойчивости капусты белокочанной (*B. oleracea*) к сосудистому бактериозу (возбудитель *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson) и фузариозу (возбудитель *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Wollenweb)), двум наиболее вредоносным заболеваниям капустных культур, для создания системы маркер-опосредованного отбора и перевода селекции капусты на устойчивость к бактериозу и фузариозу на молекулярно-генетический уровень является актуальной и удовлетворяющей интересам национальных селекционно-семеноводческих компаний России.

Маркер-опосредованный отбор с использованием ко-доминантных молекулярных маркеров кроме исключения на определенных этапах селекции необходимости создания искусственного инфекционного фона, мог бы ускорить селекционные программы на устойчивость, за счет возможности отбирать гомо- и гетерозиготы по локусам устойчивости, а главное – «пирамидировать» локусы устойчивости в новом генетическом материале.

Целью диссертационной работы Макуха Ю.А. является разработка технологического регламента ускоренного создания селекционного материала капусты белокочанной с устойчивостью к сосудистому бактериозу и фузариозу на основе применения технологий молекулярного генотипирования, в частности с использованием микросателлитных (SSR) маркеров.

Для достижения цели соискатель определил следующие задачи:

1. Подобрать ДНК-маркеры целевых генов/аллелей для изучаемого набора линий и расщепляющихся популяций капусты белокочанной.
2. На основе гибридизации контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу линий капусты белокочанной создать расщепляющиеся популяции F2.

3. Установить сцепление подобранных SSR-маркеров(а) с признаками устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу на созданных сегрегирующих популяциях (F2-поколение).

4. Выявить ДНК-маркерные системы локусов устойчивости к сосудистому бактериозу и устойчивости к фузариозу для использования в селекционных программах на устойчивость.

Научная новизна. Впервые в России на линиях капусты белокочанной 269-Яс12п-2 и Пи714, контрастирующих по признаку устойчивости к сосудистому бактериозу при инокуляции 1 расой *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, и линиях Дт-46 и Кб1П., контрастирующих по признаку устойчивости к фузариозу при инокуляции *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Wollenweb.), проведена оценка поли-/мономорфности коллекции молекулярных маркеров. Описано совместное проявление маркера Ol10-C01 с проявлением устойчивости к сосудистому бактериозу, и маркера Ol10-D01 с проявлением устойчивости к фузариозу в сегрегирующих по данным признакам F2-популяциях капусты белокочанной.

Практическая значимость заключается в выявлении ДНК-маркеров: маркера Ol10-C01, сцепленного с локусом устойчивости к сосудистому бактериозу, и маркера Ol10-D01, сцепленного с локусом устойчивости к фузариозу, изученных наборов линий.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Информативные ДНК-маркерные системы по идентификации в гибридном материале капусты белокочанной локусов устойчивости к сосудистому бактериозу Хсс и внедрение их в селекционные программы.

2. Высокополиморфные ДНК-маркерные системы для визуализации гена устойчивости к фузариозу *Foc1* и его алельного состояния в генотипах гибридных растений капусты белокочанной.

3. Создание исходного материала капусты белокочанной на основе классических методов селекции и биотехнологических подходов (молекулярное маркирование), а также на основе проведения фенотипирования по изучаемым признакам с использованием фитопатологических методов.

Структура диссертации традиционная – включает титульный лист, оглавление, введение, основную часть, представленную 3 главами: обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение; заключение (выводы), практические рекомендации, список использованной литературы и приложение. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 58 рисунков и 1 приложение.

Библиографический список включает 105 наименований, в том числе 62 на иностранных языках.

В Главе 1 «Обзор литературы» автор рассматривает и обсуждает вопросы биологии капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.), проблемы сосудистого бактериоза капусты белокочанной, симптомов сосудистого бактериоза, расового состава *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, устойчивости к сосудистому бактериозу, проблемы фузариозного увядания капусты белокочанной, расового состава *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* и наследования устойчивости к фузариозу, использования полимеразной цепной реакции в генетических исследованиях, типов ДНК-маркеров.

В Главе 2 «Материалы и методы» автор описывает и количественно представляет изученный в работе исходный материал капусты белокочанной, молекулярные маркеры, используемые в исследовании, место и условия проведения исследований, представляет методы исследований: Выделение ДНК, оптимизация ПЦР, Электрофорез НК, методы оценки на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу, статистический анализ расщепления.

В Главе 3 «Результаты и обсуждение» представлены результаты исследований в соответствии с целью и поставленными задачами, а именно:

- представлены результаты оценки поли-/мономорфности коллекции молекулярных маркеров (20 шт.) из базы данных VegMarks, 5 шт. маркеров (Tonu et al., 2013), 9 шт. маркеров (Afrin et al., 2018) на устойчивой и восприимчивой к сосудистому бактериозу линиях капусты белокочанной 269-Яс12п-2 и Пи714;
- представлено сопоставление данных ДНК-анализа по маркеру Ol10-C01 и фенотипического анализа устойчивости/восприимчивости к сосудистому бактериозу растений популяции F2 от скрещивания линий капусты белокочанной 269-Яс12п-2 и Пи714;
- представлены результаты оценки поли-/мономорфности коллекции молекулярных маркеров (30 шт.) из базы данных VegMarks, 3 шт. маркеров (Lv et al., 2011; Lv et al., 2013; Lv et al., 2014a), на устойчивой и восприимчивой к фузариозу (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) линиях капусты белокочанной ДТ-46 и Кб1П;
- представлено сопоставление данных ДНК-анализа по маркерам Ol10-D01, M10 и фенотипического анализа устойчивости/восприимчивости к фузариозу растений популяции F2 от скрещивания линий капусты белокочанной ДТ-46 и Кб1П;
- представлены данные ДНК-анализа по маркеру Ol10-D01 растений популяции BC1 от скрещивания гибрида капусты белокочанной ДТ-46xКб1П с линией ДТ-46;
- представлены данные статистического анализа (χ^2) расщепления популяциях F2 и BC1F1 по генотипу и фенотипу

Достоверность результатов не вызывает сомнений, исследования выполнены в соответствии с общепринятыми методиками, результаты интерпретированы с использованием соответствующих статистических методов анализа. Научные положения, выводы, предложения для практической селекции базируются на подробном анализе экспериментальных данных.

Основные результаты диссертационной работы апробированы на 6 международных научно-практических конференциях и заседаниях методической комиссии ФГБНУ «ФНЦ риса» (2018-2022 гг.), опубликованы в 5 печатных работах, в том числе в двух научных статьях в изданиях, рекомендованных ВАК России, и в 2 изданиях, индексируемых Web of Science.

Замечания и недостатки:

В обзоре литературе автор не рассматривает и не описывает состояние устойчивости существующего сортимента капустных культур, известные генетические источники и доноры устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу капусты, характер наследования и особенности фенотипического проявления устойчивости к этим заболеваниям, не описывает и не использует в своей работе известные молекулярные маркеры на гены/QTLs устойчивости в том числе родственных видов *Brassica*.

В обзоре также отсутствует информация о проблеме, связанной с созданием искусственного инфекционного (сбор, сохранение возбудителя, подготовка и проведение инокуляции, оценка проявления симптомов, условия среды, сроки оценки и др.) для корректной оценки устойчивости/восприимчивости растений и возможных подходов при ее решении. В разделе «типы ДНК-маркеров» автор не рассматривает современные маркерные системы SNP, KASP и др. Все это свидетельствует о недостаточной теоретической проработке.

Автор не всегда корректно использует термины и понятия. Например, целью исследований является разработка «технологического регламента», **технологический регламент** – один из документов, относящихся к Единой системе технологической документации (ЕСТД), которая в свою очередь входит в состав Единой системы технологической подготовки производства – ЕСТПП (<https://gostus.com/>), при этом в выводах диссертации о регламенте как результате ничего не сказано.

Автору необходимо выяснить для себя, в чем состоит изогенность изогенных линий 269-Яс12п-2 и Пи714, Дт46 и Кб1П, что представляет из себя «зарраженная почва», что такая специфическая комбинационная способность (СКС) линий (стр. 42).

Сомнительным является, что для выделения ДНК из свежих листьев требовалось 2 г. ткани, как правило используют 200 мг, т.е. в 10 раз меньшее количество ткани.

Из главы материалы и методы не ясно, чем руководствовался автор, выбирая для скрининга 20 SSR-маркеров (стр. 30-31), был ли осуществлен подбор с учетом их локализации на группах сцепления генома *C Brassica oleracea L.*, было ли это количество маркеров минимально достаточным с точки зрения автора для решения поставленной задачи.

Нет описания метода оценки, расчета силы сцепления («сонаследуемости») маркеров и признаков устойчивости/восприимчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу.

Текст диссертации недостаточно структурирован, в главе «Материалы и методы» представлены фрагменты обзора литературы (например, на стр. 32, 33, 36), смесь результатов и обзора (2, 3 абзац на стр. 38), в главе «Результаты и обсуждения» представлены фрагменты обзора литературы (стр. 40), это осложняет восприятие информации и свидетельствует об игнорировании автором принципов изложения научного труда.

На рисунках электрофорограмм (кроме 18 и 23) не представлен маркер длин ДНК-фрагментов, что не позволяет делать заключение об амплификации целевого фрагмента маркера, а также усложняет сравнительный анализ амплифицированных ДНК-фрагментов разных образцов и в разные годы исследования.

На рисунке 11 очевиден полиморфизм амплифицируемых фрагментов ДНК устойчивой и восприимчивой линий при использовании маркера OI10-F06 при этом автор идентифицирует данный маркер как мономорфный.

В результатах не представлены обобщенные данные фенотипического анализа устойчивости/восприимчивости к сосудистому бактериозу на искусственном инфекционном фоне и данных генотипирования по маркерам OI11-H06, BoESSR726 растений расщепляющейся популяции F2 (269-Яс12п-2 x Пи714), не представлены обобщенные данные фенотипического анализа устойчивости/восприимчивости к фузариозу и данных генотипирования по маркерам OI10-D01, M10 растений расщепляющейся популяции F2 (ДТ-46 x К61П) для оценки силы сцепления «маркер – признак» и проверки выводов автора «сонаследуемости» маркеров с признаком устойчивости необходимо дополнительно обрабатывать и анализировать информацию (табл. 6, 7).

Перечисленные замечания не умаляют практической ценности выполненной работы, научной значимости полученных автором результатов. К очевидным достоинствам работы можно отнести:

- 1) выполненный большой объем экспериментальной работы и проведения комплексной оценки источников исходного материала с использованием метода молекулярно-генетического анализа и фенотипирования в провокационных условиях;
- 2) выявленные генетические маркеры, имеющие связь с признаками устойчивости капусты белокочанной к сосудистому бактериозу и фузариозу.

Диссертация по теме «МОЛЕКУЛЯРНОЕ МАРКИРОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ BRASSICA OLERACEA L. НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СОСУДИСТЫМ БАКТЕРИОЗУ И ФУЗАРИОЗУ» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития селекции и семеноводства высокопродуктивных гетерозисных гибридов капусты белокочанной. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации. Рукопись отвечает критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» от 24.09.2013 №842, раздел II, п.9-14, а ее автор Макуха Юлия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Официальный оппонент,
доктор сельскохозяйственных наук
по специальности 06.01.05 – селекция и
семеноводство сельскохозяйственных
растений, профессор, заведующий кафедрой
ботаники, селекции и семеноводства
садовых растений ФГБОУ ВО «Российский
государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А.Тимирязева»

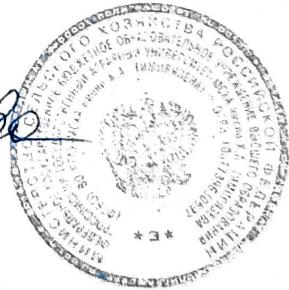
Монахос Сократ Григорьевич

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49
тел. +7 (499) 976-41-71, e-mail: s.monakhos@rgau-msha.ru

24.11.2022 г.

Подпись
заверяю

Руководитель службы кадровой
политики и приема персонала



ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Макуха Юлии Александровны «Молекулярное маркирование в селекции *Brassica Oleracea* L. на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Актуальность темы исследования.

Решение проблемы создания устойчивых к болезням сортов и гибридов Капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) возможно с помощью селекции с применением молекулярно-генетических методов, а также разработки ДНК-маркерных систем по идентификации целевых генов, основанной на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Это позволит повысить урожайность такой важнейшей овощной культуры за счёт создания генотипов с заданными свойствами и при этом в короткие сроки, что является актуальным для селекционеров и сельхозпроизводителей. Сокращение селекционного процесса за счёт проведения контроля переносимых целевых генов из одного организма в другой значительно повышает конкурентоспособность и импортозамещение отечественных гибридов, что подтверждает актуальность данной тематики для региона и страны.

Научная новизна.

Впервые в России разработан технологический регламент селекционной схемы капусты белокочанной на основе применения методов молекулярного маркирования для ускоренного создания конкурентоспособных гибридов, устойчивых к сосудистому бактериозу и фузариозу. Изучено сонаследование апробированных в работе молекулярных маркеров с признаком устойчивости к сосудистому бактериозу и фузариозу на сегрегирующих популяциях капусты белокочанной. Определены информативные кандидатные ДНК-маркерные системы: Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc* и Ol10-D01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, которые рекомендованы в селекционный процесс для ускоренного создания устойчивых генотипов к сосудистому бактериозу и фузариозу.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Диссертация Макуха Ю.А. характеризуется несомненной научной ценностью. Полученные информативные кандидатные ДНК-маркерные системы: Ol10-C01 – для локуса устойчивости к сосудистому бактериозу *Xcc*

и О110-Д01 – для гена устойчивости к фузариозу *Foc1*, и селекционный материал (растения F2 гибридных комбинаций 269-Яс-12п x Пи714, ДТ-46 x КБ1П) можно использовать для программы по созданию перспективной генетической плазмы капусты белокочанной, соответствующей агроклиматическим условиям юга России, обладающей повышенной урожайностью; устойчивостью к сосудистому бактериозу и фузариозу.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Степень достоверности результатов исследований достигнута достаточным объемом полученных экспериментальных данных, проведением статистических обработок и выявлением достоверности различий.

Полученные автором результаты исследований прошли достаточно широкую апробацию: доложены на 6 научных конференциях и опубликованы в 5 печатных работах, из них 2 – в изданиях, включенных в перечень ВАК РФ, 2 – входит в наукометрическую базу Web of Science, 1 – входит в базу РИНЦ.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Тема диссертационной работы «Молекулярное маркирование в селекции *Brassica Oleracea* L. на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу», представленная Макуха Ю.А., носит комплексный и системный характер. Для ее раскрытия автором использован широкий круг научных источников.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора научной литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, рекомендаций селекционной практике и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включающих 9 таблиц, 58 рисунков, что достаточно полно иллюстрирует излагаемый материал. Список использованной литературы включает 105 источников, в том числе 62 иностранных авторов.

Во введении обоснована актуальность диссертационного исследования; сформулированы цель и основные задачи работы; характеризуется степень новизны полученных результатов, практической ценности и их апробация. Кроме того, дается краткая характеристика диссертации.

Обзор научной литературы содержит информацию об имеющихся на сегодняшний день данных по изучаемой проблеме. В главе рассмотрены биология капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.), приводятся описание симптомов болезней сосудистого бактериоза и фузариозного увядания, расовый состав *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, механизмы наследования устойчивости к данным патогенам,

использование полимеразной цепной реакции в генетических исследованиях и типы ДНК-маркеров. Обзор написан грамотно, что свидетельствует о высоком уровне теоретической подготовки автора.

Во второй главе автором подробно описаны используемые методы, такие как: выделение ДНК из листьев растений капусты белокочанной, подбор оптимальных условий для проведения ПЦР, проведение электрофореза, проведение фитопатологического тестирования. Описаны молекулярные маркеры, используемые в исследовании: SSR-маркеры на устойчивость к сосудистому бактериозу, молекулярные маркеры на устойчивость к фузариозу. Описан статистический анализ расщепления.

В третьей главе «Результаты исследований» проводится анализ полученных собственных результатов и литературных данных. В данной главе описаны: селекция капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу, апробация SSR-маркеров на контрастных по устойчивости к сосудистому бактериозу изогенных линиях и селекционных образцах капусты белокочанной, проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к сосудистому бактериозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР-анализа, апробация молекулярных маркеров на контрастных по устойчивости к фузариозу изогенных линиях и селекционных образцах капусты белокочанной, проведение фитопатологического тестирования на устойчивость к фузариозу и сравнение полученных данных с результатами ПЦР-анализа, апробация информативного SSR-маркера OI10-D01 на BC1F1-популяции, статистическая проверка достоверности полученных данных методом хи-квадрата (χ^2). Экспериментальная часть работы изложена последовательно и логично. Диссертационную работу завершают выводы, рекомендации селекционной практике и список использованной литературы. Выводы соответствуют цели и задачам исследования, корректны, обоснованы и полностью включают в себя результаты работы.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации.

Диссертация Макуха Ю.А. представляет собой важное, интересное и профессионально выполненное исследование, соответствующее статусу научно-квалификационного труда. Материалы, изложенные в диссертации «Молекулярное маркирование в селекции *Brassica Oleracea* L. на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу», соответствуют паспорту специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Диссертация написана грамотно, оформлена аккуратно. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации.

Вопросы и замечания по содержанию диссертации.

Несмотря на многочисленные достоинства диссертации, в ней имеются отдельные недоработки редакционного характера и замечания, которые серьёзно не влияют на общее благоприятное впечатление о работе:

В главе 1 «Обзор литературы» недостаточно раскрыты вопросы по распространению и расовому составу сосудистого бактериоза и фузариозного увядания капусты белокочанной в России и в Краснодарском крае. Не представлены примеры по использованию полимеразной цепной реакции в генетических исследованиях устойчивости овощных культур к болезням как в России, так и в других странах.

В главе 2 «Материалы и методы» не указано количество гибридов какого поколения было изучено при фитопатологических исследованиях, не ясна выборка изученных растений.

В главе 3.1 «Результаты и обсуждения» в результатах селекции капусты белокочанной на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу не указано количество полученных гибридов каждого поколения.

В рисунках 1, 3 и др., где представлены схемы, не понятно это оригиналы или информация взята из литературных источников.

На рисунках 6-15 и др., где представлена визуализация продуктов ПЦР, не представлен Маркер молекулярной массы Mm.

По тексту диссертации при написании латинских названий капусты белокочанной, возбудителей бактериоза и фузариоза указывается полное название не однократно: на стр. 45, 48, 65, 89 и др.. Принято указывать один раз полное название (*Xanthomonas campestris* rv. *Campestris*), затем сокращенно (*X. campestris*).

На стр. 24 имеются орфографические ошибки в окончаниях слов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

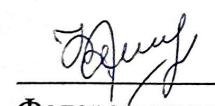
Диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком уровне. В работе приведены результаты экспериментов, позволяющие ее квалифицировать как разработку научно-обоснованных экономических и технических решений, внедрение которых вносит значительный вклад в решение важнейших научно-производственных задач и ускорение экономического роста России. Новые научные результаты, полученные диссидентом, имеют существенное

значение для российской науки и практики в области селекции, семеноводства и биотехнологии растений. Работа написана доходчиво, грамотно и аккуратно оформлена. Выводы и рекомендации обоснованы.

Таким образом, диссертация Макуха Юлии Александровны является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение вопросов создания устойчивых к болезням сортов и гибридов Капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) с помощью селекции с применением молекулярно-генетических методов, а также разработки ДНК-маркерных систем по идентификации целевых генов, основанной на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Диссертация «Молекулярное маркирование в селекции *Brassica Oleracea* L. на устойчивость к сосудистому бактериозу и фузариозу» соответствует п.9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842, а автор Макуха Юлия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

11.11.2022

Официальный оппонент
кандидат биологических наук по специальности
06.01.07- защита растений,
ведущий научный сотрудник лаборатории
фитосанитарного мониторинга агроэкосистем

 Кремнева Оксана Юрьевна
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений»
350039, г. Краснодар, п/о-39, ФГБНУ ФНЦБЗР
+7(861)228-17-71
E-mail: kremenoks@mail.ru

Подпись Кремневой О.Ю. 
Ученый секретарь ФГБНУ ФНЦБЗР

Е.А. Есауленко

