

ОТЗЫВ

официального рецензента на диссертационную работу

Пожарского Александра Сергеевича на тему «Изучение генофонда и редактирование генома сортов томата казахстанской селекции», представленную на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «Биотехнология»

№ п/п	Критерии	Соответствие критериям (подчеркнуть один из вариантов ответа)	Обоснование позиции официального рецензента (замечания выделить курсивом)
1.	Тема диссертации (на дату ее утверждения) соответствует направлениям развития науки и/или государственными программам	1.1 Соответствие приоритетным направлениям развития науки или государственным программам: 1) диссертация выполнена в рамках проекта или <u>целевой программы, финансируемого(ой) из государственного бюджета (указать название и номер проекта или программы);</u> 2) диссертация выполнена в рамках другой государственной программы (указать название программы); 3) диссертация соответствует приоритетному направлению развития науки, утвержденному Высшей научно-технической комиссией при Правительстве Республики Казахстан (указать направление).	Диссертация выполнена на базе РГП на ПХВ «Институт биологии и биотехнологии растений» в рамках программ целевого финансирования Комитета науки МОН РК: - BR18574149 «Создание высокопродуктивных сортов и линий сельскохозяйственных культур на основе инновационных биотехнологий» (2023–2024 гг.); - BR21882269 «Использование технологий редактирования генома для повышения продуктивности экономически важных культурных растений» (2023–2025 гг.).
2.	Важность для науки	Работа вносит/не вносит существенный вклад в науку, а ее важность хорошо <u>раскрыта/не раскрыта</u> .	Работа вносит значительный вклад в развитие: 1- генетики и селекции томата за счёт изучения генетического разнообразия сортов казахстанской селекции с использованием микросателлитных маркеров и маркеров устойчивости к грибковым и вирусным патогенам; 2 - практического применения технологии редактирования генома CRISPR/Cas9 для

		повышения устойчивости томата к мучнистой росе. В диссертационной работе подробно обоснована научная и практическая значимость проведённого исследования. Полученные результаты могут способствовать расширению применения технологии CRISPR/Cas9 при создании новых сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к заболеваниям, а также снижению зависимости от химических средств защиты растений, что имеет важное значение для устойчивого развития сельского хозяйства.
3.	Принцип самостоятельности	Уровень самостоятельности: 1) <u>высокий</u>; 2) <u>средний</u>; 3) <u>низкий</u>; 4) <u>самостоятельности нет.</u>
4.	Принцип внутреннего единства	4.1 Обоснование актуальности диссертации: Актуальность диссертационной работы полностью обоснована на основе анализа доступных научных публикаций. 1) <u>обоснована</u>; 2) <u>частично обоснована</u>; 3) <u>не обоснована.</u> 4.2 Содержание диссертации отражает тему диссертации: 1) <u>отражает</u>;
		Содержание диссертации в полной мере отражает выбранную тему исследования.

	2) частично отражает; 3) не отражает.		
	4.3. Цель и задачи соответствуют теме диссертации: 1) соответствуют; 2) частично соответствуют; 3) не соответствуют. 4.4 Все разделы и положения диссертации логически взаимосвязаны: 1) полностью взаимосвязаны; 2) взаимосвязь частичная; 3) взаимосвязь отсутствует. 4.5 Предложенные автором новые решения (принципы, методы) аргументированы и оценены по сравнению с известными решениями: 1) критический анализ есть; 2) анализ частичный; 3) анализ представляет собой не собственные мнения, а цитаты других авторов; 4) анализ отсутствует.	Цели и задачи соответствуют теме диссертации и охватывают ключевые аспекты проведённой работы. Все разделы и положения диссертации полностью логически взаимосвязаны, следующие из них выводы являются результатом исследований, проведенных с использованием современных, обоснованно выбранных методов молекулярной биологии и биотехнологии, основаны на объективных данных, обработаны методами статистического анализа. Методические подходы, использованные Пожарским А.С. в ходе выполнения диссертационного исследования, а также полученные результаты критически аргументированы и оценены по сравнению с известными решениями, представленными в отечественных и зарубежных литературных источниках.	
5.	Принцип научной новизны 1) полностью новые; 2) частично новые (новыми являются 25-75%); 3) не новые (новыми являются менее 25%).	Научные результаты и положения обладают научной новизной как на национальном, так и на международном уровне. Впервые проведена характеристика генетического разнообразия сортов томата казахстанской селекции в сравнении с	

		зарубежными аналогами. Местные сорта томата впервые использованы в качестве исходного материала для повышения устойчивости к инфекционным заболеваниям с применением методов геномного редактирования. Кроме того, в работе внесён вклад в выявление гомологических связей между генами белков семейства MLO у покрытосеменных растений, а также осуществлён прогноз возможного влияния редактирования этих генов на формирование устойчивости у представителей различных таксономических групп.
	5.2 Выводы диссертации являются новыми?	Выводы диссертационной работы представляют собой обоснованное обобщение полученных результатов и чётко отражают научную новизну исследования как на национальном, так и в определённой степени на международном уровне.
	1) полностью новые;	Применённые в работе методы, включая генотипирование и геномное редактирование с использованием системы CRISPR/Cas9, впервые внедрены в практику отечественной селекции томата, что подчёркивает их научную новизну и актуальность на национальном уровне.
	2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
	3) не новые (новыми являются менее 25%).	
	5.3 Технические, технологические, экономические или управленческие решения являются новыми и обоснованными:	
	1) полностью новые;	
	2) частично новые (новыми являются 25-75%);	
	3) не новые (новыми являются менее 25%).	

6.	Обоснованность основных выводов	Все основные выводы <u>основаны/не основаны</u> на весомых с научной точки зрения доказательствах либо достаточно хорошо обоснованы (для qualitative research (квалитатив ресеч) и направлений подготовки по искусству и гуманитарным наукам).	Основные выводы диссертации основаны на всестороннем анализе современных научных публикаций, результатах молекулярно-генетических и биотехнологических экспериментов, а также на применении статистически обоснованных методов обработки данных. Это обеспечивает высокую степень достоверности и научной обоснованности полученных результатов. Однако в ряде случаев некоторые аспекты считать доказанными преждевременно, и они требуют дополнительного изучения.
7.	Основные положения, выносимые на защиту	Необходимо ответить на следующие вопросы по каждому положению в отдельности: 7.1 Доказано ли положение? 1) доказано; 2) скорее доказано; 3) скорее не доказано; 4) не доказано; 5) в текущей формулировке проверить доказанность положения невозможно. 7.2 Является ли тривиальным? 1) да; 2) нет; 3) в текущей формулировке проверить тривиальность положения невозможно. 7.3 Является ли новым? 1) да; 2) нет;	1. Отечественные сорта томата открытого грунта близки к российским по генетическим признакам (совпадения SSR-генотипов 60-100%, сходство по STRUCTURE - до 95%). Маркеры вирусной устойчивости у казахстанских сортов не выявлены. Установлены семь сортов, устойчивых к <i>Fusarium oxysporum</i>, и два - к <i>Phytophthora infestans</i>. Сорта «Меруерт» и «Лидер» выбраны для CRISPR/Cas9-редактирования. Искользованные методы ранее применялись за рубежом, но впервые адаптированы для задач томатной селекции в Казахстане, что обуславливает их частичную новизну. <u>7.1 Скорее доказано</u> <u>7.2 Нет</u> <u>7.3 Да</u> <u>7.4 Средний</u>

		3) в текущей формулировке проверить новизну положения невозможно. 7.4 Уровень для применения: 1) узкий; 2) средний; 3) широкий; 4) в текущей формулировке проверить уровень применения положения невозможно. 7.5 Доказано ли в статье? 1) да; 2) нет; 3) в текущей формулировке проверить доказанность положения в статье невозможно.	<u>7.5 Да</u> 2 Мутации в генах SIMlo5 и SIMlo8 не приводят к увеличению резистентности по сравнению с мутацией гена SIMlo1. Секвенирование целевых участков редактирования генов SIMlo подтверждает наличие генетического мозаицизма: от 20 до 50% прочтений, покрывающих область делеции, демонстрирует отсутствие делеции. Приобретаемая устойчивость к мучнистой росе сохраняется при мозаицизме. <u>7.1 Скорее не доказано</u> <u>7.2 Нет</u> <u>7.3 Да</u> <u>7.4 Средний</u> <u>7.5 в текущей формулировке проверить доказанность положения в статье невозможно.</u> Положение требует подтверждения. 3. Выявлен высокий консерватизм последовательностей SIMlo1, SIMlo5, SIMlo8 генов в кодирующих регионах (отсутствие вариантов в гене SIMlo1, 2 синонимичных варианта в гене SIMlo5, 2 синонимичных и 2 миссенс замены в гене SIMlo8), на основе имеющихся данных по геномной изменчивости 166 линий томата. В частности, была подтверждена инвариантность выбранных сайтов узнавания нРНК. Таким образом,
--	--	---	--

			разработанные нРНК могут использоваться на любых сортах и линиях томата с высоким шансом на специфичность редактирования благодаря 100% консервативности выбранных сайтов узнавания. <u>7.1 Доказано</u> <u>7.2 Нет</u> <u>7.3 Да</u> <u>7.4 Широкий</u> <u>7.5 Да</u>
8.	Принцип достоверности.	8.1 Выбор методологии - обоснован или методология достаточно подробно описана:	Выбор исследовательской методологии является обоснованным и соответствует современному научному подходу, что обеспечивает достижение поставленных целей и задач. Методология подробно изложена в соответствующем разделе диссертации, что способствует прозрачности и воспроизводимости проведённого исследования. Результаты диссертационного исследования получены с использованием современных методов, включая молекулярную биотехнологию, генетическую инженерию, биоинформатический анализ и статистическую обработку данных.
	Достоверность источников и предоставляемой информации	1) да;	
		2) нет.	
		8.2 Результаты диссертационной работы получены с использованием современных методов научных исследований и методик обработки и интерпретации данных с применением компьютерных технологий:	
		1) да;	
		2) нет.	

9	Принцип практической ценности	8.3 Теоретические выводы, модели, выявленные взаимосвязи и закономерности доказаны и подтверждены экспериментальным исследованием (для направлений подготовки по педагогическим наукам результаты доказаны на основе педагогического эксперимента): 1) <u>да</u> ; 2) <u>нет</u> .	Обсуждаемые теоретические положения, модели, выявленные взаимосвязи и закономерности обоснованы и подтверждены результатами экспериментальных исследований. Однако для интерпретации отдельных аспектов, таких как влияние мозаицизма и функциональная роль мутаций в генах <i>SlMlo5</i> и <i>SlMlo8</i> , требуются дополнительные исследования.
		8.4 Важные утверждения <u>подтверждены</u> /частично подтверждены/не подтверждены ссылками на актуальную и достоверную научную литературу.	Все основные обсуждаемые утверждения подтверждены ссылками на актуальную и достоверную научную литературу.
		8.5 Использованные источники литературы <u>достаточно</u> /не достаточно для литературного обзора.	Использованный список литературы включает в общей сложности 228 источников, в том числе 222 источника на английском языке, что обеспечивает всеобъемлющее покрытие исследования авторитетными источниками и постановку проблем в критическом контексте.
		9.1 Диссертация имеет теоретическое значение: 1) <u>да</u> ; 2) <u>нет</u> .	Теоретическая значимость диссертации обусловлена, с одной стороны, впервые проведённой молекулярной характеристикой сортов томата казахстанской селекции, а с другой — расширением и уточнением представлений об эволюции белков и генов группы <i>MLO</i> у высших растений.

	9.2 Диссертация имеет практическое значение и существует высокая вероятность применения полученных результатов на практике: 1) да; 2) нет. 9.3 Предложения для практики являются новыми: 1) полностью новые; 2) частично новые (новыми являются 25-75%); 3) не новые (новыми являются менее 25%).	Диссертация обладает практической значимостью, и полученные результаты имеют высокий потенциал для применения в прикладной селекции томата в Казахстане, что подтверждается положениями, выносимыми на защиту. Представленные предложения являются новыми для условий Казахстана и в контексте сортов местной селекции. Новизна проявляется, в частности, в сочетании молекулярно-геномного анализа с прикладным отбором объектов для редактирования генома, что ранее не применялось в отечественной практике селекции томата.
10.	Качество написания и оформления 1) высокое; 2) среднее; 3) ниже среднего; 4) низкое.	Качество научного изложения диссертации находится на высоком уровне. Текст написан в соответствии с общепринятыми нормами академического стиля и оформлен согласно требованиям действующих стандартов, включая нормы ГОСТ.
11.	Замечания к диссертации	В работе не представлена в полной мере информация, необходимая для оценки корректности и воспроизводимости экспериментов по редактированию генов <i>SlMo</i>. В частности: 1. В тексте диссертации отсутствует чёткая информация о последовательностях направляющих РНК (нРНК): не указано, какие конкретно целевые участки были выбраны в генах <i>SlMo1</i>, <i>SlMo5</i> и <i>SlMo8</i>, а также по каким критериям осуществлялся их выбор. Не ясно, проводился ли <i>in silico</i> анализ на предмет off-target эффектов. 2. Не пояснено, почему предполагалась мутация преимущественно в виде делеции. Отсутствует обсуждение других возможных типов мутаций (вставки, замены), характерных для CRISPR/Cas9. 3. Оценка мозаицизма вызывает вопросы: насколько корректно делать вывод о наличии мозаицизма только на основании доли прочтений с/без делеции целевых участков у предполагаемых мутантных растений, без сравнения с контрольными (нетрансформированными) образцами?

	4. Учитывая, что томат является диплоидным растением, следовало бы отдельно оценивать редактирование каждого из аллелей. При мутации только одного аллеля возможно сохранение экспрессии и функции второго, что особенно важно для точного интерпретирования фенотипа устойчивости. Однако степень мутагенеза по каждому аллелю отдельно в работе не оценивалась. 5. Отдельного внимания заслуживает уточнение: какие именно регионы генов <i>SlMlo1</i>, <i>SlMlo5</i> и <i>SlMlo8</i> продемонстрировали высокий уровень консерватизма? Эти данные важны для обоснования универсальности разработанных нРНК. Тем не менее, указанные замечания не умаляют научной ценности выполненной работы и могут рассматриваться как рекомендации для дальнейших исследований соискателя.
12.	Научный уровень статей докторанта по теме исследования (в случае защиты диссертации в форме серии статей официальные рецензенты комментируют научный уровень каждой статьи докторанта по теме исследования) По теме диссертационного исследования опубликовано 10 научных работ, в том числе: – 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в 1–2 квартили по импакт-фактору в базе данных <i>Web of Science</i>; – 1 статья в отечественном журнале, рекомендованном Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования; – 4 тезиса международных научных конференций; – 1 методическое пособие; – 1 патент на полезную модель. Указанные публикации отражают основные положения и результаты исследования, выполнены на академическом уровне и соответствуют действующим требованиям к защите диссертации на соискание степени доктора философии (PhD).
13.	Диссертационная работа соответствует требованиям Правил присуждения учёных степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание степени доктора философии (PhD). На основании представленных результатов считаю, что Пожарский А. С. заслуживает присуждения степени доктора философии (PhD) по специальности «Биотехнология».

Официальный рецензент:

Заведующая лабораторией генетической инженерии растений,
ТОО «Национальный центр биотехнологии»

к.б.н.

Манабаева Ш. А.

