

Утверждаю

«18» сентября 2017 г.
директор ВИР
д.б.н., профессор,
Н. И. Дзюбенко

ОТЗЫВ

ведущего учреждения на диссертацию Костерина Олега Энгельсовича
«Эволюция и геногеография дикорастущих форм рода Горох (*Pisum* L.)»
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность данной работы определяется уже самим объектом исследования и его значением в сельскохозяйственном производстве нашей страны. В период СССР она была главным мировым производителем гороха, имея посевные площади более 6 млн. га. В РФ, к сожалению, они значительно и неоправданно снизились, тем не менее, достигают в отдельные годы почти 1 млн га. Не смотря на значительное число сортов, включенных в Госреестр селекционных достижений РФ, разнообразие почвенно-климатических условий нашей страны, систематическое появление новых стрессоров, изменение климата, создание новых сортов гороха никогда не утрачивало своей актуальности. Большинство современных сортов гороха создано на основе рецессивных мутаций, что увеличило технологичность уборки, неполегаетость, способствовало неосыпаемости семян, улучшению их качества и т.п. Однако приданию сортам большей адаптивности должна способствовать интрогрессия в селекционные сорта аллелей ценных признаков из диких родичей или староместных сортов, более полное использование ресурса генетической информации, сохраняемой в коллекциях генбанков мира. Известно и неоспоримо, что селекция очень сузила генетический базис современных сортов, при этом мало используя названный ресурс. Между тем, у диких форм гороха обнаружены гены устойчивости к мучнистой росе, показана частичная устойчивость к ржавчине (*P. fulvum*). У *P. sativum* subsp. *elatius* - устойчивость к заразихе, аскохитозу и стеблевой гнили. Уже на практике получены линии устойчивые к гороховой зерновке после скрещиваний культурного гороха с *P. fulvum*. Сведения об этом приводятся автором диссертации.

В связи с выше сказанным, сведения о первичном и вторичном генпуле вида *Pisum sativum* L., куда входят дикие родичи, крайне актуальны.

Необходимы знания об их разнообразии, географическом распространении, степени родства, критериях разделения видов, в частности, репродуктивных барьерах, эволюции, истории дивергенции с культурным видом и т.п. Именно этим вопросам и посвящена работа О.Э.Костерина.

Новизна работы. По масштабу и уровню задач это первая за многие годы (формально за последние 20 с небольшим) монографическая работа о горохе - непростом ботаническом объекте в силу большого полиморфизма рода и при этом классическим объекте генетики. Срок, казалось бы, небольшой, но именно на этот период пришелся качественный скачок генерации новых методов в биологии и, в частности, широкое использование достижений молекулярной генетики. Применение молекулярных методов позволило существенно расширить фундаментальные исследования в области генетики и эволюции растений. Использование этих методов в работе известного генетика гороха О.Э.Костерина определило ее качественно другой методический уровень по сравнению с предыдущей монографической работой «Горох» Р.Х.Макашевой (1995). Она основывалась на данных морфологии, кариологии, иммунохимии, и филогенетические построения при этом не исключали субъективных элементов, поскольку опыт и интуиция исследователя дополняли скудость филогенетических маркеров и базировались на достаточно противоречивых и очень дробных таксономических построениях. В работе О.Э.Костерина много различных методических профилей: разработки автора находятся на стыке классической генетики, молекулярной генетики, геногеографии, ботаники (систематики и филогении), филогенетики, элементов репродуктивной биологии, экспедиционных ботанических обследований. Совокупность этих подходов (возможно, мы перечисли не все), свидетельствует о фундаментальности представленной работы.

Принципиальное отличие данной диссертации от предшествующих монографических работ по гороху – использование молекулярных данных, которые изменили «разрешающую способность» таксономических и филогенетических построений. Молекулярные признаки многочисленны, большинство их гомологично, особенно у родственных объектов, их анализы воспроизводимы, легко формализуются. Практика показала, что филогенетические построения, созданные при анализе отдельных генов, реально устойчивы и подтверждены на уровне геномов. На этом фоне принцип радикалов, на которых базировалась внутривидовая классификация Р.Х.Макашевой, выглядит анахронизмом.

Из современных филогенетических реконструкций рода *Pisum* стало очевидно, что культивируемый посевной горох представляет лишь одну из

множества филетических ветвей гороха, при этом большинство прочих ветвей были слабо проработаны. Их значительно более детальную проработку и сделал автор данной диссертации. При этом филогенетическая и геногеографическая реконструкция истории рода потребовали таксономического переопределения материала, уточнения его дикого либо культурного статуса и учета географического происхождения. Автор выявил, казалось бы, парадоксальную, но, увы, существующую ситуацию: многие образцы гороха, значащиеся в мировых генетических коллекциях в качестве дикорастущих, не являются таковыми. Тем не менее, мы не можем согласиться с мнением О.Э.Костерина о том, что в мировых коллекциях имеется всего около 100 образцов дикого гороха (с.17 диссертации). Неужели приведенные в главе о горохе в книге «Grain legumes» (2015, ed. A.M.de Ron) данные о числе диких родичей гороха в основных мировых коллекциях гермоплазмы столь катастрофически не верны? Авторы данной статьи указывают суммарно 1551 образец с максимальным числом в центре Джона Иннеса, Израильском генбанке и в ICARDA (Warkentin et al., 2015). Даже при учете наличия многочисленных дублетов таких образцов в мире вряд ли так мало, как считает О.Э.Костерина. Кроме того, косвенно о степени разнообразия европейских коллекций гороха, определяемой в значительной степени и дикими образцами, говорится в статье Jing et al., 2012 («Genetic diversity in European *Pisum*...»), как ни странно, не процитированной автором. Хотелось бы узнать его аргументацию подробнее.

Вместе с тем, нельзя не отметить предельно щепетильный подход автора к изучаемому материалу. Не принятие «на веру», а экспериментальную проверку статуса каждого предложенного ему образца, знакомство с ним «на ты». Это позволило выполнить работу на аутентичном материале и отказаться от целого ряда образцов, как не соответствующих указанному в их паспорте статусу дикого.

Что касается системы рода Горох, построенной на данных морфологии и кариологии, она неоднократно менялась. Наиболее распространенные системы принадлежали Л.И.Говорову (1937), признававшему 5 видов, Davis (1970), Cipicha (1981) и Р.Х.Макашевой (1995), признававших два вида. Автор диссертации придерживается системы N. Maxed and M.Ambrose (2001), называя ее компромиссной, и, по нашему мнению, действительно удобной. В конце диссертации автор предлагает свою систему с учетом новых таксономических реконструкций трибы Fabeae.

Овладение современными ботаниками навыками молекулярно-генетических исследований (проводимых, впрочем, как правило, совместно с соответствующими специалистами) и умением трактовать и использовать

полученные данные при решении вопросов систематики и филогении, достаточно распространено. Однако в лице автора данной диссертации мы имеем практически уникальный пример того, как генетик овладел сложными представлениями о ботанической систематике, филогении, таксономии, ботанической номенклатуре. Без такого интегрированного методологического подхода, который мы уже упоминали выше, невозможно сделать работу такого глобального уровня.

Принципиально новым по отношению к роду *Pisum* является исследование его геногеографии – географического распространения аллелей. Автор диссертации провел оригинальное исследование найденных им комбинаций аллелей трех диморфных молекулярных маркеров из трех клеточных геномов (ядерного, митохондриального и пластидного): *rbcL*, *cox1* и *SCA*. Это позволило выявить дивергенцию предковых диких форм гороха на эволюционные ветви и пути их расселения. Гипотеза распространения трех комбинаций аллелей молекулярных маркеров гороха представляет собой принципиально новую схему эволюции и распространения представителей рода. В ней предковая комбинация А, имеющая самый обширный ареал, из центра происхождения - Восточного Средиземноморья идет на запад, далее в обход Средиземного моря, где она приобрела по одной мутации в каждом из маркеров, то есть через цепочку как минимум, двух других промежуточных комбинаций мигрировала обратно в Причерноморье и Восточное Средиземноморье, уже в виде носителей апоморфной комбинации В, где встретилась с носителями исходной комбинации А в Закавказье и Малой Азии. Этот сценарий, и выявление двух эволюционных линий у диких форм, находится в согласии с филогенетическими реконструкциями автора, созданными на основе генов гистона H1. Интересен и абсолютно нов вывод о том, что культурный подвид гороха посевного произошел в результате доместикации одной из этих эволюционных ветвей, а именно В.

Уже сама геногеография, несмотря почти на свой почти вековой возраст, - достаточно новаторский подход к растительным объектам особенно в отечественной науке. Н.И.Вавилов (1927) был первым ученым, обнаружившим закономерности географического распределения генов культурных растений. В своем предварительном сообщении об этом он писал о сосредоточении доминантных генов в центре ареала, их выпадении к его периферии и накоплении там рецессивных форм. Дальнейшие его работы, на основе которых возникла эколого-географическая классификация культурных растений, относятся, скорее, к феногеографии.

Еще одним принципиально новым аспектом работы О.Э.Костерина является вывод о причинах репродуктивной изоляции видов гороха, об обнаруженном им и его коллегами конфликте ядра и пластид. Ранее определяющую роль в нескрещиваемости видов гороха придавали реципрокным транслокациям в кариотипе, что Костерин предлагает принимать с определенной осторожностью и не абсолютизировать.

Заслугой автора диссертации, имеющей **практическое значение** для селекции, является создание им репрезентативной выборки образцов - представителей различных эволюционных ветвей, наиболее полно представляющих генетическую изменчивость гороха в природе. Создание таких выборок – конструктивный путь в работе с генофондами и более рационального их использования в селекции.

Сделав обзор основных (далеко не всех) принципиально новых фундаментальных и прикладных аспектов работы О.Э.Костерина, кратко осуществим **описание структуры и содержания** работы.

Композиционно работа имеет некоторые оригинальные моменты, главным из которых является обзор литературы, превышающий по объему экспериментальную часть. Однако это не просто обзор обширной литературы по исследуемому вопросу. Это критическое осмысление имеющихся воззрений, положений, трактовок. Это глубокий исторический экскурс в систематику и филогению гороха (крайне интересно, что современные методы вернули таксономическое положение гороха к определенному для него Ламарком). Это констатация того, что сделано, что переосмыслено, в том числе самим автором и что предстоит сделать. Этот обзор очень интересен и представляет собой своего рода руководство для всех, кто серьезно занимается структурой генетического разнообразия рода Горох, будь то исследователи фундаментального или прикладного профиля.

Вторая глава «Материалы и методы» также оригинальна, поскольку наряду с перечислением использованных методов несет значительный информационный ресурс в разделах о сборах дикого гороха в природе, о критическом подходе к изучаемому материалу, а именно о выделении набора образцов истинно дикорастущих форм гороха.

Краткое содержание главы 3, посвященной геногеографии по молекулярным маркерам, изложено нами выше на стр. 3 отзыва. Но нужно добавить два важных положения, одно из которых можно отнести к открытиям. В главе изложены также результаты проверки диагностической филогенетической значимости генов гистона H1, которые автор использовал для этих целей впервые в мировой науке. Это сделано путем сравнения с применением к исследуемому материалу также и широко распространенного

маркера пластидного межгенного спейсера *psbA-trnH*. Оказалось, что этот маркер практически не позволил реконструировать филогению гороха. Автор предположил, что это во многом обусловлено тем фактом, что спейсер у гороха короток по сравнению с теми видами растений, для которых он был использован. Однако при этом впервые удалось выявить молекулярный маркер, специфичный для культурного подвида гороха *P. sativum* subsp. *sativum*: делецию длиной 8 нуклеотидных пар в позициях 142-149. По сути это открытие маркера доместикации гороха. Поиск ее у диких представителей рода может помочь в поиске непосредственного предка культурного гороха. На данный момент выявленные дикие образцы, несущие эту делецию, требуют некоторых оговорок. Но перспектива поиска таких образцов очень интересна.

Далее в главе приводятся данные о морфологии признаков (главным образом цветка) дикорастущих представителей *Pisum sativum* в свете их геногеографического анализа. Это интересно с позиций эволюции системы опыления. Обнаружение у диких горохов типичных ярких и более бледных полураскрытых цветков можно интерпретировать так: у последних меняется репродуктивная стратегия в сторону самоопыления, как это происходит у большинства культурных видов, в том числе у гороха, у которого яркий и раскрытый цветок нужно рассматривать как рудимент энтомофильного типа опыления в прошлом. Природные популяции дикого гороха весьма малочисленны и наверняка подвержены значительным колебаниям численности в разные годы. Автогамия позволяет диким популяциям более легко и быстро восстановиться, если они сократились до малого числа особей или даже до одного экземпляра. Кроме того, такие растения связаны с узко ограниченными и вполне определенными местами обитания. Благодаря автогамии адаптация их к соответствующим местам обитания вполне устойчива, что дает им преимущества в конкурентной борьбе.

Глава 4 посвящена реконструкции филогении рода Горох на межвидовом и внутривидовом уровне с использованием первичной структуры гена *His5* субтипа 5 гистона H1. В ней подробно освещены актуальность филогенетического исследования рода *Pisum* с использованием этих маркеров; изменчивость первичной структуры генов субтипов 5 и 7 гистона H1 гороха. Выявлено, что ген субтипа H1-7, специфичного для молодых тканей и органов, имел слабый филогенетический сигнал, тогда как ген минорного субтипа H1-5 успешно разрешил филогению рода даже на внутривидовом уровне. Далее автор дает возможную таксономическую интерпретацию проведенного геногеографического и филогенетического анализа и в предварительном порядке предлагает оригинальную таксономическую систему подвидов посевного гороха, которая

представляется вполне логичной в свете полученных автором результатов. При этом нам кажется вполне целесообразным его предложение в скобках о рассмотрении и третьего дикорастущего подвида *Pisum sativum* L. subsp. *biflorum* (Rafin.) Soldano.

В заключительной, 5-й главе О.Э.Костерин приводит сведения о репродуктивной совместимости базового набора образцов, отражающего генетическое разнообразие гороха восточного Средиземноморья. Хотя автор и не признает применения к этому набору термина соге-коллекция, поскольку, по его словам, не руководствовался алгоритмами, как правило применяемыми при создании таких коллекций, его вполне можно считать таковым. Дело в том, что алгоритмов создания таких наборов множество и примененный автором метод вполне можно причислить к их числу. Главное при создании такого набора – его репрезентативность, то есть отражение максимального числа вовлеченных в выборку аллелей. Хотя вполне возможно, что принцип «без чего нельзя обойтись», не вполне отражает это требование.

В главе подробно изложены результаты межвидовых и внутривидовых скрещиваний, на основе которых сделан вывод о сложности природы репродуктивной совместимости и ее нереципрокном характере между эволюционно отдаленными представителями вида *Pisum sativum* L. Поэтому по мнению автора диссертации они не могут быть адекватно учтены в иерархической таксономии рода.

С первого взгляда кажется странным необходимость проведения скрещиваний «сами-с-собой», что по сути является искусственным самоопылением с предварительной кастрацией цветков. Но и в этом эксперименте выявилась эволюционная закономерность, касающаяся системы опыления гороха, что уже обсуждалось на стр. 5 данного отзыва. Чем более окультурен горох, тем более у него развита склонность к самоопылению и даже бутонной автогамии; дикие представители, напротив, обнаруживают более позднюю компетенцию пестика к опылению – при раскрытии цветка, что свидетельствует о бывшей в его эволюции склонности к аутбридингу. Кстати, на с. 55 автор явно ошибочно называет горох факультативным перекрестником. Он мог быть таковым разве что в необозримом прошлом.

Заканчивая обзор диссертации, еще раз хочется подчеркнуть ее насыщенность новой информацией, полученной на основе применения современных биотехнологий.

Нам также хочется поблагодарить автора за полученную им генетическую информацию по целому ряду образцов нашей коллекции ВИР, что для нас очень ценно.

Несколько мелких и не слишком принципиальных замечаний.

1. Нам представляется не удачным определение объекта работы, а именно «дикорастущих форм» в названии работы. Было бы лучше «диких представителей рода Горох». Во-первых, слово дикорастущий скорее употребимо к особям окультуренного вида, которые не затронуты селекцией и растут в дикой природе. Это можно отнести ко многим видам бобовых: чины посевной, вики посевной, люцерны посевной, люпина многолетнего и т.д. В связи с этим неверно говорить «дикорастущие виды» по отношению к диким видам. К примеру, есть дикие лошади, но не «дико бегающие» лошади. Во-вторых, термин «форма» в данном контексте может быть употреблен только как низшая таксономическая единица. Все это занижает масштабность работы, поскольку автор оперирует совсем другими категориями, включая эволюционные ветви.
2. Автор пишет живо и образно. Однако нужно строже относиться к терминологии. К примеру, не применимы термины «внешность» (с. 51, 243) или «родственники» в смысле «родичи» (с. 17, 11 и др.) по отношению к гороху. Вряд ли правомерно понятие «Внешние признаки» в названии подглавы 3.5. (с. 193). Следовательно, существуют и «внутренние» признаки?
3. К признакам «дикости» диссертант относит только раскрываемость (напрасно, на наш взгляд, отвергая термин «растрескиваемость») и мелкозернистую поверхность семенной оболочки. Следует отметить, что в генофонде гороха, особенно у староместных и старых селекционных сортов имеются растрескивающиеся бобы.
К признакам «дикости» можно отнести и признак осыпаемости семян, поскольку селекционеры потратили немало усилий для устранения этого признака дикого типа путем введения в генотипы сортов рецессивного аллеля *def*.

Еще раз оговоримся, что замечания не принципиальны для данной работы, не могут изменить ее по существу и не снижают достоинств.

Основные результаты и выводы диссертации нашли отражение в 19 публикациях автора на русском и английском языках в высокорейтинговых журналах, в том числе рекомендованных ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований. Кроме того, методология исследования и его промежуточные результаты прошли апробацию в ходе ряда российских и международных конференций, симпозиумов и семинаров, где автор выступал с докладами. При этом нужно отметить, что работы О.Э.Костерина часто цитируются в работах как отечественных специалистов (которых мало), так и зарубежных генетиков гороха, с которыми, впрочем, он имеет ряд совместных статей и в чье международное сообщество давно и прочно вошел.

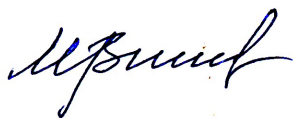
Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего изучения эволюции, филогении, геногеографии, популяционной геномики рода Горох, но при этом будут интересны и полезны также и селекционерам гороха. Поскольку селекцией гороха в нашей стране занимается не менее 30 НИУ, избежим перечисления каких-либо конкретных. Материалы диссертации могут быть включены в лекционные курсы по генетике растений и в практические занятия по частной генетике в ВУЗах.

Заключение.

Диссертация О.Э.Костерина «Эволюция и геногеография дикорастущих форм рода Горох (*Pisum L.*)» является законченной научно-квалификационной работой, вносящий весомый вклад в фундаментальные исследования экономически значимой в РФ зернобобовой культуры. При этом задачи, решенные автором диссертации, имеют и важное хозяйственное значение. Диссертация полностью соответствует критериям, установленным постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842 (пп.9,10,11,13,14) «Положения о порядке присуждения ученой степени»), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Отзыв заслушан и утвержден на заседании отдела генетических ресурсов зернобобовых культур 15 сентября 2017 г., протокол № 1.

*Рецензент доктор биол. наук, профессор,
гл. н. сотр., зав. отд. генетических ресурсов
зернобобовых культур, профессор
Вишнякова Маргарита Афанасьевна*



ФАНО ФГНБУ «Федеральный исследовательский центр. Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)
Адрес – 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44.
e-mail: m.vishnyakova.vir@gmail.com; телефон: +7(812)312-51-61

