

## ОТЗЫВ

о диссертации И.Н. Леоновой «Генетический контроль устойчивости к грибным болезням у мягкой пшеницы с интрогрессиями от *Triticum timopheevii* Zhuk.», представляемой на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности: 03.02.07 – генетика

**Актуальность избранной темы исследований** Ирины Николаевны Леоновой определяется важностью в мировом масштабе научных задач, на решение которых они направлены, а именно: (1) выяснение закономерностей передачи генетического материала при отдаленных скрещиваниях; (2) обогащение генофонда возделываемого вида мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. ( $2n=6x=42$ , ВВААDD) аллелями генов и локусами количественных признаков (QTLs), полученными от других видов пшеницы и видов близкородственных родов; (3) апробирование микросателлитных маркеров для получения генотипов с заданными характеристиками. Более того, результаты проведенных исследований также оказались актуальными, поскольку они наглядно демонстрируют один из путей повышения эффективности селекции. Во-первых, за счет создания нового типа исходного материала, хорошо охарактеризованного в генетическом отношении и содержащего не только ценные аллели генов или QTLs, но и тесно сцепленные с ними маркеры, наблюдая за которыми можно ускорить процесс переноса определенных аллелей генов и QTLs в перспективный селекционный материал и, во-вторых, посредством внедрения в селекцию нового методического подхода – маркер-ориентированного отбора.

**Высокая степень обоснованности научных положений, вынесенных на защиту, сделанных выводов и сформулированных в диссертации рекомендаций** достигается:

- обобщением и критическим анализом результатов большого числа ранее выполненных и современных научных работ по изучаемым вопросам;
- репрезентативными размерами выборок растительного материала, использованного для оценки, и его многолетним полевым изучением;
- комплексным применением классических и современных методов для выявления и хромосомной локализации в геноме мягкой пшеницы фрагментов интрогрессии генома мало окультуренного и трудно скрещивающегося с ней тетраплоидного вида *T. timopheevii* Zhuk. ( $2n=4x=28$ ,  $GGA^tA^t$ ), а также для локализации и картирования генов и QTLs;
- использованием в качестве маркеров микросателлитов, широко представленных в геномах различных видов пшеницы и видов близкородственных родов и адекватных для оценки генетического разнообразия растительного материала, геномов, хромосом и их фрагментов;
- применением надежных методов статистической обработки результатов исследований;
- хорошим знанием Интернет-ресурсов и владением специально разработанными для построения молекулярно-генетических карт и картирования генов и QTLs компьютерными программами, находящимися в свободном доступе;

– публикацией основных результатов диссертационной работы в рецензируемых зарубежных и отечественных центральных изданиях и широким обсуждением их на международных и всероссийских конференциях и съездах.

### **Научная новизна исследований**

состоит в том, что

- (1) широко апробированы микросателлитные маркеры в идентификации чужеродного генетического материала в геноме мягкой пшеницы;
- (2) установлено влияние генотипической среды сорта-реципиента мягкой пшеницы на число и хромосомную локализацию фрагментов интрогрессии хромосом от *T. timopheevii*;
- (3) выявлены, локализованы и картированы новые гены и QTLs, контролирующие устойчивость к грибным болезням и другие хозяйственно-ценные признаки. Определены типы их взаимодействия;
- (4) с использованием молекулярных маркеров разработаны способы ускоренного получения устойчивых к бурой ржавчине линий мягкой пшеницы, на которые получены патенты;
- (5) расширена теоретическая и практическая база для проведения фундаментальных и прикладных исследований по интрогрессии чужеродного материала в геном мягкой пшеницы;
- (6) созданы линии-доноры мягкой пшеницы с эффективными аллелями генов устойчивости к бурой ржавчине.

### **Достоверность результатов, выводов и рекомендаций** обеспечивается:

- четкой постановкой задач исследований;
- хорошо продуманными и логично выстроенными экспериментами;
- использованием адекватных цели и задачам методов исследований;
- применением методов статистики в сочетании с качественным анализом полученных результатов и их всесторонним обсуждением;
- подтверждением выводов экспериментальными данными, приведенными в 36 таблицах и 30 рисунках основного текста диссертации и Приложения.

**Теоретическая и практическая значимость** диссертационной работы определяются тем, что в ней:

- 1) содержатся новые знания по генетике различных признаков видов *T. aestivum* и *T. timopheevii*, особенностях интрогрессии чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы;
- 2) предложена и опробована технологическая схема выявления и картирования в геноме мягкой пшеницы генетического материала вида *T. timopheevii*, поиска у интрогрессивных линий эффективных генов и QTLs устойчивости к грибным болезням;
- 3) показаны возможности микросателлитных маркеров в решении всего комплекса задач, связанного с интрогрессией чужеродного материала в геном мягкой пшеницы;
- 4) существенно повышен уровень изученности созданной в ИЦиГ СО РАН оригинальной коллекции из 48 интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом от *T. timopheevii*. По ним создана оценочная база данных,



содержащая их фенотипические и генотипические характеристики. Линии могут быть рекомендованы для использования в селекции в качестве источников новых генов устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе;

5) определены молекулярные маркеры *Xgwm814-Xgwm1257* и *Xwmc146c-Xgwm1017a-Xgwm1103* для идентификации эффективных локусов *QLr.icg-5B* и *QPt.icg-5D* устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе, соответственно, а также контроля в процессе их переноса в геном мягкой пшеницы. Обнаружено 10 высокоинформативных маркеров (*Xgwm66, 273, 372, 566, 614, 617, 720, 736a, 843, 1165*) для различения сортов мягкой пшеницы, из которых четыре (*Xgwm273, 372, 614, 736a*) картированы и полиморфны в геноме *T. timopheevii*;

6) в виде таблицы обобщены сведения о локализации и характере полиморфизма 502 SSR-маркеров у мягкой пшеницы и *T. timopheevii*. В качестве справочной эту таблицу можно использовать для выявления гибридных форм, содержащих генетический материал *T. timopheevii*, а также для подбора микросателлитных маркеров с целью оценки генетического разнообразия материала, отдельных геномов, хромосом и плеч хромосом.

#### Анализ работы

Диссертация И.Н. Леоновой – объемный многолетний завершённый труд. Материал изложен на 343 стр. машинописного текста, включает введение, четыре главы (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение), каждая из которых представлена тремя-пятью разделами, некоторые из них имеют заключение. В конце дано общее заключение, выводы, списки сокращений и литературы. Диссертация иллюстрирована 47 таблицами, 34 рисунками и снабжена приложением (54 стр.), включающим 8 таблиц и 11 рисунков. В таблицах приведены сведения о молекулярных маркерах генов устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине, мучнистой росе, результаты оценки интрогрессивных линий и родительских сортов к грибным болезням, даны показатели продуктивности и высоты растений, списки микросателлитных локусов, их локализация, характеристика и рассчитанный индекс разнообразия для родительских сортов, интрогрессивных линий и *T. timopheevii*.

**Введение** написано в соответствии с требованиями ВАК РФ. В нем представлены все разделы, необходимые для общей оценки работы. Цель и задачи четко сформулированы.

**Глава 1** – «Обзор литературы» и **глава 4** – «Обсуждение» составлены на основе анализа 641 литературного источника, в том числе 559 – на английском языке. Они дополняют друг друга и свидетельствуют о всестороннем знании соискателем исследуемых вопросов.

В **главе 1** дана характеристика пшеницам группы *Timopheevi* по устойчивости к возбудителям грибных болезней, кратко описаны полученные с участием этих пшениц различные серии интрогрессивных линий, селекционные линии и сорта, а также переданные от них в мягкую и твердую пшеницу гены устойчивости. Особое внимание уделено влиянию генотипической среды сорта-реципиента на проявление признаков устойчивости и других селекционно-важных признаков. Значительная часть главы

посвящена рассмотрению генетических маркеров, прежде всего, ДНК-маркеров, а также задач, схем, стратегий маркер-ориентированной селекции.

В целом в обзоре литературы исчерпывающе показаны предпосылки выбора соискателем темы исследований.

В главе 2 четко описан использованный растительный материал. Это 48 интрогрессивных линий, цитологически стабильных, 42-хромосомных и устойчивых в полевых условиях к бурой ржавчине. Родительскими формами линий были сорта мягкой пшеницы, вид *T. timopheevii* и синтетический амфидиплоид *T. timopheevii/Aegilops tauschii* из Болгарии. Линии получены в ИЦиГ СО РАН другими сотрудниками и любезно предоставлены соискателю. Кроме того, для картирования генов и QTLs самой Ириной Николаевной созданы различные гибридные популяции  $F_2$  и получены гибридные семьи  $F_3$  и  $F_4$ .

С достаточной степенью детализации приведены использованные методы: выделение ДНК и микросателлитный анализ, лабораторные и полевые оценки устойчивости растений пшеницы к возбудителям бурой ржавчины (*Puccinia recondita* Rob. Ex Desm. f. sp. *tritici*) и мучнистой росы (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici* Em. Marchal), оценка растительного материала по хозяйственно-ценным признакам, кластерный анализ и другие методы статистического анализа, методы и компьютерные программы для построения молекулярно-генетических карт хромосом, выявления групп сцепления и картирования генов. Некоторое недоумение вызывает раздел, посвященный фитопатологической оценке материала. Соискатель не дает каких-либо пояснений, почему оценку материала проводили на базе различных учреждений России: ИЦиГ СО РАН, его филиал (СибНИИРС), ФГБНУ ВНИИ фитопатологии (п. Большие Вяземы, Московская обл.) и за рубежом (Институт генетики и селекции растений и Федеральный исследовательский центр культурных растений, Германия)? Насколько сопоставимы результаты, полученные с использованием различных тест-изолятов?

В главе 3 представлены собственные исследования соискателя, которые объединены в четыре раздела.

Раздел 3.1. содержит результаты изучения молекулярно-генетического разнообразия 36 интрогрессивных линий, полученных от скрещивания пяти сортов мягкой пшеницы с пшеницей Тимофеева (*T. timopheevii*). Сравнительным анализом материала по 161 микросателлитному локусу известной локализации убедительно показаны различия хромосом, групп хромосом и геномов по числу выявленных аллелей. В кластерном анализе интрогрессивные линии объединились в пять групп, каждая из которых была образована одним из родительских сортов и линиями, созданными с его участием. Эти данные легли в основу вывода 1. Трудно согласиться лишь с предположением Ирины Николаевны о происхождении наиболее отличающихся линий 157 и 728 от каких-то других образцов мягкой пшеницы. В этом случае, вероятнее всего, они не образовали бы с другими интрогрессивными линиями и их родительским сортом одну группу.

Тот факт, что геном пшеницы Тимофеева имеет специфичные аллели по многим микросателлитным локусам, локализованным в определенных хромосомах, соискатель успешно использовал для локализации и оценки протяженности интрогрессивированных



фрагментов хромосом. Сделано важное заключение о влиянии генотипа сорта мягкой пшеницы на число и локализацию фрагментов интрогрессии, но не на их протяженность (вывод 2). Различия по протяженности чужеродных фрагментов хромосом отмечены между геномами: фрагменты, включенные в геном *B*, были более протяженными и захватывали оба плеча хромосомы, а в геном *A* – наиболее короткими.

**В разделе 3.2.** описаны результаты исследований по локализации у интрогрессивных линий генов и QTLs, контролирующих устойчивость к болезням.

Для получения  $F_2$  гибридов соискателем были отобраны устойчивые к бурой ржавчине интрогрессивные линии 832-2, 842-1 и 842-2, BC5 и BC9, в основе которых один и тот же сорт Саратовская 29, при этом сами линии различались по числу, локализации и размерам фрагментов интрогрессии хромосом, полученных от пшеницы Тимофеева или синтетического амфидиплоида *T. timopheevii/Ae. tauschii*. Все эти линии скрещивали с восприимчивым сортом Скала и растения  $F_2$  каждой из комбинаций скрещивания (всего 847 растений) генотипировали с использованием полиморфных маркеров, локализованных в семи хромосомах, содержащих фрагменты интрогрессии. Число использованных для генотипирования маркеров варьировало в зависимости от комбинации скрещивания от 76 до 502. Устойчивость гибридных растений к фитопатогенам определяли на основании тестирования полученных от них семей  $F_{3-4}$ . На рис. 7, 9 и 12 показаны распределения растений семей  $F_3$  по устойчивости к бурой ржавчине, а на рис. 15 – к мучнистой росе. Однако в тексте диссертации не дано каких-либо объяснений, зачем и на каком основании объединяли все растения  $F_3$  в одну выборку, если результаты оценки семей планировали использовать для уточнения характеристик индивидуальных растений  $F_2$  (см. с.80)?

Полученные результаты по генотипированию показали, что порядок расположения маркеров на хромосомах, содержащих генетический материал пшеницы Тимофеева, практически соответствовал тому, что известен для хромосом популяции ITMI. Простое интервальное картирование выявило у линий 842-2 и 832-2 наличие трех основных локусов, влияющих на проявление устойчивости, в хромосомах 5B (локус обозначен  $QLr.icg-5B=LrTt2$ ), 2A ( $QLr.icg-2A=LrTt1$ ) и 1A ( $QLr.icg-1A$ ), а также другие локусы. У линий BC5 и BC9 – главные локусы ( $QLr.icg-2B$  и  $QLr.icg-2D$ ) находились в хромосомах 2B и 2D, причем локус  $QLr.icg-2D$ , по-видимому, соответствует гену *Lr39*, полученному от *Ae. tauschii*. Для каждого локуса определены наиболее близко расположенные к нему микросателлитные маркеры и хромосомы *T. timopheevii*, от которых фрагменты произошли. Более того, с использованием метода составного интервального картирования установлено, какие из этих локусов не влияют на проявление друг друга, а какие взаимодействуют между собой по типу ингибирования. Важно отметить, что четыре выявленных локуса  $QLr.icg-5B=LrTt2$ ,  $QLr.icg-2A=LrTt1$ ,  $QLr.icg-1A$  и  $QLr.icg-2B$  оказались не только эффективными, но и новыми.

Аналогичный подход был использован диссертантом также для картирования локусов, ассоциированных с устойчивостью линии 832-2 к мучнистой росе. Обнаружен новый локус устойчивости  $QPm.icg-6D$ , полученный в составе транслокации 6DS.6DL-6A<sup>1</sup>L от хромосомы 6A<sup>1</sup> *T. timopheevii*, и описан характер его действия.

Таким образом, соискателю удалось раскрыть генетическую природу устойчивости интрогрессивных линий к грибным болезням (выводы 3-6), что, безусловно, является большим научным достижением.



В разделе 3.3. представлены данные по изучению влияния чужеродного хроматина на проявление признаков продуктивности, высоты растения и продолжительности периода всходы-колошение. Исследования проводили с целью определить возможности дальнейшего использования интрогрессивных линий в качестве источников и доноров устойчивости к болезням. Они базировались на сравнительной оценке интрогрессивных линий серии *T. aestivum*/*T. timopheevii* и родительских сортов мягкой пшеницы, а также изучении F<sub>2</sub> гибридной популяции от скрещивания линии 832-2 с сортом Скала для поиска и локализации локусов, ассоциированных с проявлением названных выше признаков.

На составленных соискателем молекулярно-генетических картах хромосом локализовано 52 QTLs, в том числе 19 в пределах интрогрессированных фрагментов с положительными и отрицательными аддитивными эффектами. Следует отметить, что фрагменты интрогрессии, содержащие локусы устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе, не оказывали какого-либо негативного влияния на хозяйственно-ценные признаки. Именно этот факт соискатель посчитал важным и выделил его как вывод 7. В табл. 30 этого раздела им приведены данные изучения одной и той же гибридной популяции F<sub>3-4</sub> в течение трех лет, однако ни в этом разделе, ни в главе 2 ничего не сказано о том, как был организован такой опыт?

В небольшом разделе 3.4. обсуждаются результаты эксперимента, описывающего использование интрогрессивной линии 832-2 в качестве донора главного локуса устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B*.

Исходя из того, что линии с множественными фрагментами интрогрессии не всегда пригодны для селекционного использования, поскольку чужеродный генетический материал, перенесенный в новую генетическую среду, может оказывать отрицательное влияние на проявление различных признаков, и что для отбора растений с множественными интрогрессиями требуются большие по размеру гибридные популяции и много времени для их анализа, соискатель предложила создавать новые формы с единичными целевыми чужеродными локусами. Решение этой сложной генетической задачи стало возможным благодаря появлению технологии маркер-ориентированного отбора, что и продемонстрировано в рецензируемой работе.

Для получения новых форм с главным локусом устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B* Ирина Николаевна использовала схему маркер-контролируемого беккроссного отбора. На первом этапе в BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> поколении от скрещивания донорской линии 832-2 с сортом реципиентом Саратовская 29 были генотипированы 60 растений с помощью 72 полиморфных маркеров, картированных на хромосомах с интрогрессиями чужеродного материала, отобраны растения только с фрагментами в хромосоме 5B. Эти растения еще раз беккроссированы на реципиентный сорт, и среди 114 потомков BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> поколения по результатам их генотипирования 78 маркерами еще раз проведен отбор всего четырех растений с транслокацией хромосомы 5G в хромосому 5BL. По результатам проверки по устойчивости к бурой ржавчине потомства этих гибридных растений в последовательных поколениях самоопыления отобрана наиболее устойчивая линия 5366-180. Чтобы доказать возможность использования этой линии в качестве донора главного локуса *QLr.icg-5B* соискатель получил гибриды F<sub>2</sub> от скрещивания ее с одной из селекционных восприимчивых линий, генотипировал 71 растение с помощью

трех микросателлитных маркеров по участку, в котором расположен locus устойчивости, затем объединил их в пять групп в зависимости от наличия тех или иных аллелей вблизи изученного локуса и оценил семьи  $F_3$  по устойчивости к бурой ржавчине в сравнении с родительскими формами и *T. timopheevii*. В конечном итоге, убедительно показано, что перенос единичного целевого фрагмента возможен, для контроля процесса передачи нужны, по меньшей мере, два фланкирующих этот locus маркера, причем один из них должен характеризоваться кодоминантным типом наследования (вывод 8).

Выполнение рассмотренного сложного многоэтапного эксперимента, несомненно, свидетельствует о высокой методической квалификации соискателя, свободном владении приемами маркер-ориентированного отбора.

В главе 4 обсуждается природа вертикальной и горизонтальной устойчивости, распределение выявленных генов устойчивости, QTLs других признаков и в целом фрагментов интрогрессии по хромосомам, их связь с маркерами и влияние на урожайность. Рассматриваются преимущества ДНК-маркеров в сравнении с цитологическими маркерами для выявления фрагментов интрогрессии хромосом. Поставлен очень важный вопрос о числе маркеров, характере и степени их полиморфизма для оценки генетического разнообразия линий, сортов, образцов, выявления дифференциации и взаимосвязей между ними. Однако в контексте предложенной диссертантом технологической схемы поиска и введения в коммерческие сорта генов устойчивости к грибным болезням от других видов пшеницы и видов близкородственных родов проблема маркеров не получила должной широты обсуждения. Например, остался открытым вопрос, как подобрать микросателлитные маркеры для вида, какой ранее не был охарактеризован с их помощью? Всегда ли отправной точкой должны служить списки полиморфных маркеров мягкой пшеницы или следует учитывать другие виды, генетически к виду-донору генов более близкие? Какое число ДНК-маркеров необходимо и достаточно для получения объективной и стабильной характеристики степени генетических различий и взаимосвязей образцов вида-реципиента и вида-донора? Как ДНК-маркеры должны распределяться по хромосомам этих видов? Кроме того, следовало бы дополнить предложенную соискателем схему требованием цитологической стабильности создаваемых интрогрессивных линий и необходимостью получения картирующих популяций, о чем написано в соответствующих главах диссертации.

В целом все вынесенные на защиту положения и сформулированные соискателем выводы базируются на большом, хорошо осмысленном экспериментальном материале. Рукопись иллюстрирована качественно выполненными схемами и рисунками, написана хорошим литературным языком, легко и с интересом читается. Однако она не лишена некоторых неточностей и опечаток:

с.8 – нуждается в уточнении название рис. 1, на нем представлены этапы технологической схемы не «создания коммерческих сортов мягкой пшеницы, устойчивых к грибным болезням», как пишет соискатель, а введения в них эффективных генов устойчивости;

на с. 17 написано, что пшеница Тимофеева была найдена и описана в «30-х годах прошлого века», на самом деле это 1922 г., т.е. 20-е годы прошлого века. На той же



странице не указаны территории Ирака и северной Сирии, где также была обнаружена полба дикая аракатская;

с.21, 92 – некорректное использование термина «комплексная устойчивость» для описания материала, устойчивого к возбудителям двух и более грибных болезней. В этом случае речь должна идти о групповой устойчивости;

с. 35 Sharbati Sonora – это один, а не два разных сорта;

с.55, в табл. 2, скорее всего, приведены не сами картирующие популяции, а их типы;

с.81 – дана неправильная ссылка на табл. 4;

с.91 – в табл.11 пропущена линия 747 сорта Саратовская 29;

не совпадают названия раздела 3.4., приведенные в оглавлении и на с. 166.

Встречаются неудачные выражения, как «дикорастущая разновидность *T. araraticum*» (с. 17).

Перечисленные выше неточности, а также сделанные при анализе отдельных глав замечания существенного негативного влияния на общую высокую оценку работы не оказывают. **Автореферат и печатные работы И.Н. Леоновой в полном объеме отражают содержание диссертации.**

По своей актуальности, уровню научной новизны, теоретической и практической значимости диссертационная работа И.Н. Леоновой соответствует критериям, предъявляемым Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, так как в ней разработаны теоретические положения и получены результаты, совокупность которых можно квалифицировать как **новое крупное научное достижение в области молекулярно-генетических основ преобразования геномов растений при межвидовых скрещиваниях, генетики пшеницы, экспериментального тестирования приемов маркер-ориентированной селекции.** Автор работы **Леонова Ирина Николаевна** заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика. Научные разработки диссертанта целесообразно использовать во всех учреждениях ФАНО, занимающихся культурными растениями, прежде всего, пшеницей, а также в учебных курсах по генетике и селекции растений в МГУ, Санкт-Петербургском, Новосибирском и других ГУ, Тимирязевской академии, Аграрных университетах.

Официальный оппонент  Ольга Павловна Митрофанова  
доктор биол. наук,

старший научный сотрудник

193313 Санкт-Петербург,

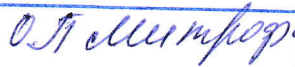
Пр. Большевиков, д.9, корп. 1, кв. 490

8(812)-571-73-22 раб.; +79633415850 мобил.

[o.mitrofanova@vir.nw.ru](mailto:o.mitrofanova@vir.nw.ru)

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

главный научный сотрудник, зав. отделом генетических ресурсов пшеницы

Подпись   
**УДОСТОВЕРЯЕТСЯ**  
Зав. канцелярией ВИР



