

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального государственного
бюджетного научного учреждения



«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ЗЕРНА

ИМЕНИ П. П. ЛУКЬЯНЕНКО»

академик РАН А. А. Романенко

« 6 » августа 2019 г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу

Дубина Елены Викторовны

«ДНК-технологии (молекулярное маркирование) в селекции риса и
семеноводстве овощных культур»

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности: 06.01.05-селекция и семеноводство сельскохозяйственных
растений

1.Актуальность избранной темы. Современное развитие селекции растений невозможно представить без применения молекулярно-генетических методов. Особенно актуально использование новых биотехнологических подходов для создания устойчивых сортов к вредоносным болезням, в изучении молекулярно-генетической структуры грибных фитопатогенов, и в частности пирикулярриоза (*Pyricularia oryzae* Cav).

Несомненно, актуально использование ДНК – технологий в семеноводстве.

2.Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства. В рамках государственного задания на 2007-2012 гг. по темам 04.03.02.02 «Создать устойчивые к пирикулярриозу линии риса с использованием методов ДНК-маркирования» и 04.05.03.02. «Изучить на основе ДНК-анализа сортовые качества семян овощных культур для совершенствования семеноводческого процесса», а также Программ фундаментальных научных исследований Государственной академии наук на 2013-2020 гг.: раздел 10 «10.4. «Растениеводство»: подраздел 150 по теме №0685-2014-0039: «Создать новые линии риса, устойчивые к пирикулярриозу»

с использованием методов маркерной селекции»; подраздел 149 по теме №0685-2014-0037 «Разработать методику оценки сортовых качеств семян перца сладкого, капусты белокочанной на основе молекулярно-генетического подхода для совершенствования семеноводческого процесса».

Связь работы с крупными научными программами. Исследования проводились в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) №16-44230178 «р_а»; РФФИ №16-44-230435 «р_а» в 2016-2018 гг. и контрактов по программе «У.М.Н.И.К.» (№Зр от 4 марта 2010 г. и №9557р/14195 от 4 июля 2011 года).

3. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Научная новизна исследований определяется разработкой мультипраймерной системы для идентификации двух генов устойчивости к пирикуляриозу $Pi-1+Pi-2$, $Pi-ta+Pi-33$, $Pi-ta+Pi-b$, позволяющей в течение одной ПЦР определить в гибридных растениях с пирамидированными генами резистентности к пирикуляриозу одновременно два гена устойчивости к патогену. Это сокращает время и затраты на ПЦР-анализ и повышает эффективность использования метода.

Из семи заявленных автором пунктов новизны к мировому уровню следует отнести второй, характеризующий разработку мультипраймерной системы для идентификации одновременно двух генов устойчивости к пирикуляриозу. Остальные шесть пунктов имеют статус российской новизны.

Впервые методами маркерной селекции на основе отечественной генплазмы созданы сорта риса Альянс, Ленарис, Капитан с геном устойчивости к пирикуляриозу $Pi-ta$, сорт риса Пируэт с тремя генами устойчивости к пирикуляриозу ($Pi-1$, $Pi-2$, $Pi-33$) и сорт Пентаген с пятью генами устойчивости к пирикуляриозу ($Pi-1$, $Pi-2$, $Pi-33$, $Pi-ta+Pi-b$).

В третьем пункте новизной обладает исследование по выявлению генов резистентности к пирикуляриозу для юга России, которые рекомендованы для практической селекции и программ по созданию устойчивых генетических ресурсов риса.

В четвертом пункте приведена генетическая паспортизация штаммов патогенна *P. oryzae*, выделенных из гербарного материала, собранного в рисовых агрофитоценозах на территории юга России. На основе этих исследований созданы две базы данных, которые содержат информацию об аллельном состоянии ДНК-локусов, изученных штаммов.

Впервые в России на основе метода молекулярного маркирования создан материал риса, совмещающий в себе гены устойчивости к пирикуляриозу и гены толерантности к длительному затоплению как фактору борьбы с сорной растительностью. Проведен анализ сонаследования SSR-маркера Sub1A203 с геном *Sub1A*.

Впервые в отечественной селекции создан селекционный материал, устойчивый к низким положительным температурам в период прорастания

семян риса. Отобраны два информативных SSR-маркера RM24545 и RM569, которые показали высокий уровень полиморфизма между устойчивыми и восприимчивыми сортами риса.

Впервые на основе метода ПЦР разработана методическая схема контроля генетической однородности семян-гибридов F₁, капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L.) и перца сладкого (*Capsicum annuum* L.) на образцах коллекции ВНИИ риса.

Полученные автором результаты являются новыми и оригинальными, что подтверждают публикации в научных журналах, 76 из которых входят в базу РИНЦ, из них 45 в периодических изданиях, рекомендованных ВАК, в том числе три научные работы, входящие в базу данных статей Web of Sciences и 1-Scopus.

Новизна очевидна и обозначена в заявках на получение патентов.

Выводы исследований обладают несомненной новизной и основательностью, а предложения для практической селекции отличаются конкретными сортами и линиями с новыми генами устойчивости к пирикулярриозу, генами толерантности к затоплению и низкой положительной температуре в фазу всходов риса.

Разработанные мультипраймерные системы для идентификации одновременно двух и трех генов резистентности к пирикулярриозу в одном генотипе рекомендуются для селекционных программ. Созданные Базы данных для анализа и мониторинга популяции для возбудителя пирикулярриоза в рисосеющих регионах юга России рекомендованы для проведения контроля за изменчивостью гриба и прогнозированию распространения болезней.

4. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов. Значимость для науки результатов исследований заключается в теоретических выводах, позволяющих использовать в работе селекционных учреждений и учебных заведениях следующие полученные знания:

- методология селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров;
- введение генов расоспецифической устойчивости *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-ta+Pi-b*, *Pi-40* из линий доноров в высокопродуктивные районированные сорта Флагман, Боярин, Снежинка, а также крупнозерных линий риса КП-163 и ВНИИР 5242;
- разработка мультипраймерных систем для идентификации и объединения устойчивых к пирикулярриозу двух и более генов в одном генотипе;
- молекулярное маркирование в селекции риса на устойчивость к пониженным положительным температурам в период прорастания семян;
- введение гена устойчивости к длительному затоплению *Sub1A* в отечественные сорта риса для борьбы с сорными растениями;

- генотипирование изолятов красnodарской популяции *Pyricularia oryzae* Cav. методом ПЦР;
- определение генов (а) вирулентности высоковариабельного грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav.

5. Практическое значение результатов и выводов диссертации, рекомендуемых к применению в селекционной практике.

Созданные образцы риса с генами устойчивости к пирикулярриозу и обладающие комплексом признаков, соответствующих агроклиматическим условиям юга России представляют ценный материал для использования в селекции на устойчивость к заболеванию.

Полученный в работе селекционный материал с генами толерантности к длительному затоплению и низким положительным температурам в фазу всходов рекомендовать к использованию для дальнейшей работы, направленной на создание образцов, устойчивых к данным стрессорам.

Разработанные мультипраймерные системы по идентификации одновременно двух и трех генов резистентности к пирикулярриозу в одном генотипе являются эффективными методами для селекционных программ по созданию перспективных форм, устойчивых к пирикулярриозу, с целью контроля целевых генов в гибридном материале.

Использование созданных баз данных для анализа и мониторинга популяций и патотипов возбудителя пирикулярриоза в рисосеющих регионах юга России, позволит вести контроль за изменчивостью гриба и прогнозировать распространение болезни.

Разработанные маркерные системы по оценке генетической однородности семян гибридов F₁ капусты белокочанной и перца сладкого позволят получать данные о генетической однородности (гибридности) реализуемых партий семян в год их производства, что является особенно важным для оригинатора.

6. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Научные положения, результаты экспериментальных исследований, выводы, являются оригинальными, обоснованными, достоверными и определяются:

- научной методологией опирающейся на опубликованные работы российских и зарубежных исследований;
- системным анализом в планировании и проведении исследований в области биотехнологии, генетики, селекции, семеноводства защиты растений и фитопатологии;
- при выполнении лабораторных и полевых экспериментов применялся комплексный подход и использовались общепринятые и оригинальные методы исследований;
- использованием современного оборудования и программ для статистического анализа полученных данных методами дисперсионного, кластерного, дискриминантного анализов, публикациями статей в научных

журналах, в том числе изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в системах цитирования Web of Sciences, Scopus и РИНЦ;

- сортами Альянс, Капитан, Ленарус с генами устойчивости к пирикулярриозу и *Pi-ta* и Пируэт с тремя генами устойчивости *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, которые переданы на государственное сортоиспытание;

- на основе молекулярно-генетического подхода изучена генетическая структура грибного фитопатогена *Pyricularia oryzae* Cav. и сформирована База данных «морфо- и ДНК- паспорт» этого возбудителя из разных экологических зон рисосеяния юга России;

- многочисленными дипломами и медалями за разработку «ДНК технологий (молекулярное маркирование) в повышении эффективности селекции и семеноводства риса», в том числе Дипломом РАСХН «За лучшую завершённую научную разработку 2012 года» и Дипломом лауреата Премии Правительства Российской Федерации от 18 декабря 2018 г. №2827-р.

7. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению.

Во введении раскрыты актуальность исследований ДНК-технологий, селекции для создания новых генотипов с заранее заданными свойствами, а также изучения молекулярно-генетической структуры грибных фитопатогенов для разработки иммуногенетической защиты от болезней.

Показана связь с ведомственными Программами НИР с двумя проектами РФФИ и двумя Международными проектами по сотрудничеству Международного Консорциума по исследованиям риса в странах с умеренным климатом, определены цель и задачи, сформулированы основные положения, обладающие научной новизной и выносимые на защиту, описаны условия и методы исследований и программы статистической обработки результатов.

В первой главе «Перспективы использования молекулярного маркирования в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений» представлены обзор литературы изложенной на 50 страницах текста разделенных на 8 тематических подразделов: понятие генетического маркера, типов молекулярных маркеров, направления использования маркеров, применения маркеров вспомогательной селекции (MAS) на рисе, особенности и состояния исследований на рисе, гены устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам и механизм их действия, гены устойчивости к пирикулярриозу, толерантности к затоплению и низким температурам в период прорастания семян риса, пирикулярриоз как объект и состояние исследований молекулярно-генетических маркеров для оценки гибридности семян F_1 овощных культур.

Глава 2 Материал и методики исследований

При проведении молекулярно-генетических исследований геномную ДНК из клеток растений и мицелия гриба выделяли по методу СТАВ; Murray and Thompson, 1980.

Аmplификацию ДНК проводили в амплификаторах «Терцик» и «BioRad», оптимизировав при этом условия ПЦР.

Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле.

Выявление результатов электрофоретического разделения продуктов ПЦР проводили с использованием бромистого этидия в УФ свете.

Гибридизацию материнских форм растений риса проводили методом пневмокастрации, опыление «Твелл»-методом (Лось, 1987).

Донорные аллели генов *Pi-1*, *Pi-2*, *Pi-33*, *Pi-40* выявляли тесно сцепленными с ними фланкирующими микросателлитными маркерами (сиквенс взят из базы данных NCBI, (Senior M., et al., 1996).

Для идентификации гибридных растений генов *Pi-ta* и *Pi-b* использовали внутригенные молекулярные маркеры (Шилов, 2016).

Для идентификации гена *Sub1A*, а также донорных аллелей устойчивости к низким положительным температурам в период прорастания семян риса использовали праймерные пары фланкирующих микросателлитных SSR-маркеров. Сиквенс этих маркеров был взят из базы данных NCBI и тесно сцеплен с данными признаками (Takeuchi et al., 2001). Для изучения биоразнообразия фитопатогенного гриба *Pyricularia oryzae* Cav. было апробировано 41 SSR-маркер из базы данных NCBI (Adreit et al., 2007).

Для молекулярно-генетических исследований *Brassica oleracea* L. и *Capsicum annuum* L. использовали SSR из международной базы данных (Hanacek et al., 2009).

Оценка донорных линий риса и селекционных образцов на устойчивость к местной популяции *Pyricularia oryzae* Cav. проводилась в полевых условиях инфекционного питомника рисовой оросительной системы ФГБНУ «ВНИИ риса» в 2010-2018 гг. В качестве восприимчивого контроля использовали сорта риса Волгоградский и Победа 65, а устойчивого контроля – сорт риса Авангард. Оценку осуществляли учитывая два показателя: тип реакции (в баллах) и степень поражения (в процентах), используя десятибалльную шкалу Международного института риса (Коломиец, 1990).

Посев опытных образцов проводили ежегодно в первой декаде мая, согласно схемам селекционных питомников.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов дисперсионного, кластерного и дискриминантного анализов (STATISTICA 10.0 for Windows).

Соответствие опытных и теоретически ожидаемых результатов по каждому классу и всему расщеплению в целом устанавливали методом «хи-квадрата» (χ^2 ; Лобашев, 1969).

В главе 3. Результаты и обсуждения представлен основательный и многоплановый материал с подразделами 3.1-3.6, в которых рассмотрены следующие направления исследований:

В разделе 3.1. Селекция риса на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды, который состоит из трех подразделов (3.1.1-3.1.3).

В подразделе 3.1.1 приведены данные исследования селекции риса на устойчивость к пирикулярриозу на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров. В результате этого исследования на государственное сортоиспытание были переданы в 2017 году сорта риса Альянс с генами *Pi-ta* и Пируэт с генами *Pi-1*, *Pi-33*, а в 2018 году сорта риса Ленарис и Капитан с геном *Pi-ta*.

В подразделе 3.1.2 в процессе исследования было проведено объединение генов устойчивости к пирикулярриозу и разработке мультипраймерных систем по их идентификации. Разработанная мультиплексная технология идентификации одновременно нескольких генов устойчивости к пирикулярриозу была внедрена в систему маркированной селекции. На основе ее использования в 2018 году были отобраны и размножены беккроссныесамоопыленные линии риса BC_4F_2 с пирамидированными генами устойчивости к пирикулярриозу *Pi-1+Pi-2*, *Pi-b+Pi-ta*, *Pi-33+Pi-ta*.

В подразделе 3.1.3 проведено изучение селекционного материала с генами резистентности к пирикулярриозу по хозяйственно ценным признакам.

В производственном испытании в 2017 году сорт риса Альянс показал урожайность 9,1 т/га и высокие технологические свойства (неполегаемость, устойчивость к пирикулярриозу). Сорт риса Ленарис в 2018 году показал урожайность 10,6 т/га, высокую технологичность, неполегаемость и возможность к прямой уборке комбайном. Экономическая оценка эффективности полученных исследований показала прибавку к стандарту условно чистого дохода при возделывании новых сортов риса 9000-40000 руб/га при рентабельности 130%, что на 11% выше, чем у стандарта Флагман (Краснодарский край) и Южанин (Ростовская область).

В разделе 3.2 проводили исследования по молекулярному маркированию в селекции риса на устойчивость к пониженным положительным температурам в период прорастания семян. В результате генотипического маркирования среди гибридных растений риса на данный признак были отобраны линии с доминантными аллелями генов холодоустойчивости, которые переданы в селекционный процесс для изучения хозяйственных признаков.

В разделе 3.3 решали задачу введения гена устойчивости к длительному затоплению *Sub1A* в отечественную генетическую плазму риса путем отбора информативных SSR-маркеров, позволяющих четко идентифицировать этот ген методом ПЦР в полученных гибридных растениях риса.

В результате исследования был получен селекционный материал с геном *Sub1A*, а также совмещенными генами *Sub1A* и *Pi*.

В разделе 3.4 представлены результаты исследования по генотипированию изолятов краснодарской популяции *Pyricularia oryzae* Cav. методом ПЦР. Для этого был проведен мониторинг генетической структуры и биоразнообразия грибного фитопатогена *P.oryzae*, а также идентификации генов резистентности к пирикуляриозу на юге России. Из собранного гербарного материала из 25 рисосеющих хозяйств, 8 экологических зон Краснодарского края, Ростовской области и Республики Адыгея выделили 62 штамма *Pyricularia oryzae* Cav. Они были описаны по морфолого-культуральным признакам и разделены на группы (33 морфотипа). На основе разработанной мультипраймерной системы по результатам ДНК анализа для каждого штамма были получены индивидуальные генетические профили и выявлены 33 генотипа.

На базе комплекса исследований полиморфизма микросателлитных локусов и данных о размере аллелей была проведена оценка степени генетического сходства выделенных штаммов методом кластерного анализа и определено распределение кластеров в пространстве дискриминантной функции.

Полученные данные были систематизированы и составлена База данных «Штаммы патогена *Pyricularia oryzae* Cav. юга России) и База данных «Анализ популяций возбудителя пирикуляриоза риса (*Pyricularia oryzae* Cav.) по признаку вирулентности».

В разделе 3.5 показана разработка методической системы оценки генетической однородности семян F_1 *Brassica oleracea* L, основанной на полиморфизме микросателлитных SSR-маркеров. Наибольший полиморфизм между родительскими формами наблюдали по локусам Na12-F12 и Na12-A02. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 86%, а гибридологический анализ показал 96%.

В разделе 3.6 приведена оценка уровня гибридности гибридов F_1 *Capsicum annuum* L на основе метода ПЦР с использованием SSR-маркеров. Методология разработки этой схемы аналогична схеме описанной выше. Высокий уровень полиморфизма показали три SSR-маркера: CAMS-117 (хромосома11), CAMS-142 (хромосома1) и CAMS-405 (хромосома8).

Для оценки уровня гибридности районированных в Краснодарском крае гибридов F_1 перца сладкого Фишт и Памир использовали два кодоминантных SSR-маркеров: CAMS-117 и CAMS-142. Процент гибридных растений по результатам микросателлитного анализа составил 100% на гибридах Памир.

Таким образом, методическая схема оценки генетической однородности коммерческих партий семян F_1 перца сладкого может быть использована для оценки сортовых качеств семян.

В завершение исследований диссертации приведено заключение, 8 пунктов выводов и 5 пунктов предложений для практической селекции и семеноводства.

Оценивая достоинство диссертационной работы, следует отметить ее высокий уровень планирования и выполненных экспериментов. В работе убедительно показаны возможности и эффективность применения ДНК технологий в селекции риса. В целом диссертация заслуживает высокой оценки. Однако имеются и замечания:

1. В таблице 11 на стр. 136 приведены данные экономической эффективности при возделывании новых сортов риса по сравнению со стандартом, однако ничего не сообщается о структуре и формировании затрат, включая расходы на этапе научно-исследовательских и опытных работ, на создание одного сорта.

2. На рисунках 47 и 48 на стр. 145-146 на оси X не видно названий образцов.

3. Таблица 12 размещена на стр. 166-170 не по ГОСТу.

4. Рисунки 60-65 размещены на стр. 186-188 не по ГОСТу и формату.

5. Рисунки 67-70 размещены на стр. 193-195 не по ГОСТу

Однако отмеченные недостатки не умаляют основного достоинства диссертации. Автором получены новые теоретические и прикладные результаты в активно развивающейся области науки.

8. Соответствие автореферата основным положениям диссертации.

Автореферат в полной мере отражает наиболее существенные положения, выводы, рекомендации и достаточно полно содержание диссертации.

9. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.

Результаты исследований опубликованы в 95 научных работах, 76 которых входит в базу РИНЦ, из них 45 - в периодических изданиях рекомендованных ВАК, в том числе 3 научные работы, входящие в базу данных статей Web of Sciences и Scopus, 1- методические рекомендации.

В соавторстве поданы заявки на патенты сортов риса Ленарис и Капитан в 2018 году и сорта риса Альянс и Пируэт в 2017 году.

Основные положения, отражающие результаты диссертации в материалах более 10 российских и международных конференций.

В 2010 г. научная работа по созданию резистентных сортов риса с генами устойчивости к пирикуляриозу награждена золотой медалью на ВВЦ, г. Москва. В 2012 г. – получен диплом РАСН за лучшую завершённую научную разработку в конкурсе молодых ученых. В этом же году получена премия Администрации Краснодарского края в области науки за 2012 год. В 2017-2018 гг. на 19-й и 20-й Российской агропромышленной выставке «Золотая осень» были получены золотые медали.

В 2018 году соискатель совместно с коллегами института стала лауреатом премии Правительства РФ в области науки и техники за работу «Создание и внедрение устойчивых к биотическим и абиотическим стрессорам генетических ресурсов риса с использованием постгеномных и

клеточных технологий для решения проблемы импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны»

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

Таким образом, диссертация Е. В. Дубина является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема теоретического обоснования ДНК-технологии (молекулярного маркирования) в создании сортов риса и в семеноводстве овощных культур, имеющая важное хозяйственное значение для технологических решений в области селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур, внедрение которых внесет значительный вклад в развитие сельскохозяйственной отрасли страны.

По своей актуальности, научной новизне, значимости полученных результатов для науки и практики представленная работа полностью удовлетворяет требованиям, изложенным в п.п. 9-11 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением от 24.09.2013 г. № 842 Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям на соискание доктора наук, а ее автор, Дубина Елена Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности: 06.01.05-селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены на заседании отдела биотехнологии Национального центра зерна имени П.П. Лукьяненко 5 августа 2019 г., протокол № 2.

Отзыв составил:
ведущий научный сотрудник
отдела биотехнологии Национального
центра зерна имени П.П. Лукьяненко
д. б. н.

 Геннадий Иванович Иванов

Подпись Геннадия Ивановича Иванова заверяю
Ученый секретарь Национального
центра зерна имени П.П. Лукьяненко
к. с.-х. н.



 О. Ф. Колесникова

Адрес организации: 350012, Россия, Краснодарский край, г. Краснодар,
Центральная Усадьба КНИИСХ, тел.: +7861 222-69-15, 222-24-03, 222-62-62,
e-mail: kniish@kniish.ru