

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н., проф. академика РАН **Афанасенко Ольги Сильвестровны** о диссертации **Пороховиновой Елизаветы Александровны** «Генетическая коллекция льна (*Linum usitatissimum* L.): создание, анализ и перспективы использования», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.07 – Генетика, 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Лен (*Linum usitatissimum* L.) – ценная прядильная и масличная культура. Россия занимает третье в мире место по площади возделывания льна долгунца и является лидером по площади – льна масличного.

Чем лучше изучена частная генетика культуры, тем быстрее и качественней ведется ее селекция. Лен в этом отношении находится в арьергарде. Любое изучение генетики начинается с создания генетических коллекций. У льна такие коллекции созданы в Нидерландах, Франции, США, Украине. ВИР на данный момент обладает самой крупной генетической коллекцией, насчитывающей 523 линии льна. Не менее важным является и ее проработанность. Наиболее простыми считаются морфологические признаки. У льна из них достаточной изменчивостью обладают только окраски цветков и семян, всего по разным источникам описано около 60 генов, контролирующих эти признаки. Практически все коммерческие сорта льна морфологически одинаковы, а их ДНК паспортизация делает только первые шаги и не нашла своего официального применения. Поэтому для защиты авторских прав необходимо найти хорошо различимые морфологические признаки с простым генетическим контролем, не оказывающие влияние на выход конечной продукции. Наиболее востребованным из них является желтосемянность, которая, как правило, характерна для льна пищевого назначения, в том числе с низколиноленовым маслом. Это масло не теряет своих качеств при долгом хранении. Биосинтез линоленовой кислоты у льна контролируют два комплементарных гена *LuFAD3A* и *LuFAD3B*. Известны последовательности этих генов, но образцы, несущие их, запатентованы и не доступны для селекционеров.

С конца XX века в связи с развитием технологий, направленных на здоровое питание возросла роль льна не только как масличной, но и как зерновой культуры. Здесь параметрами качества помимо жирнокислотного состава становится и состав слизи оболочки семян, обладающей пенообразующими свойствами, придавая выпечке объем. Еще одним из актуальных направлений использования льна – создание биокomпозитов, где слизь вступает в качестве матрикса, а волокно льна – в качестве армирующего компонента.

В нашей стране и за рубежом остро стоит проблема расширения возделывания устойчивых к патогенам сортов сельскохозяйственных культур. В развитых странах это связано с появлением ресурсосберегающих технологий и с все возрастающими потребностями рынка в экологически чистой продукции, и расширением, так называемого органического растениеводства. Ржавчина (*Melampsora lini* (Pers.) Lev.) – один из опасных патогенов льна и в случае эпифитотии она наносит наибольший вред. Устойчивость к ней контролируют 6 генов с более чем 30 аллелями, но большинство из них не эффективно против современных рас патогена, а из оставшихся, селекционеры льна используют лишь несколько, что может спровоцировать возникновение эпифитотии.

Для любой культуры актуален поиск связи легко определяемых признаков с хозяйственно важными, что облегчает массовый скрининг образцов по ценным признакам. Наиболее ценны гены с плейотропным эффектом на признаки из обеих групп. Только большая хорошо структурированная генколлекция позволяет четко выявлять закономерности сочетания количественных и качественных признаков.

Целью работы Е. А. Пороховиновой стало создание генетической коллекции льна и на ее базе изучение наследования морфологических и хозяйственно ценных признаков, разработка основных направлений практического использования генетической коллекции льна в генетических и селекционных исследованиях.

Поставленные задачи адекватны объявленной цели и включали многоплановые исследования генетического контроля морфологических и хозяйственно-ценных признаков, изучение полиморфизма линий льна по биохимическим и реологическим показателям слизи семян и жирнокислотному составу их масла и определение корреляций внутри каждой группы признаков. В задачи исследований входил также поиск ассоциаций морфологических признаков, генотипа и родословной линий с проявлением хозяйственно ценных признаков и разработка ДНК маркеров для идентификации аллелей генов *LuFAD3A* и *LuFAD3B* низколиноленовых линий льна.

Научная новизна

Приоритетными результатами являются:

- созданная диссертантом генколлекция, включающая 317 инбредных линий;
- идентификация 41 гена, контролирующего морфологические признаки льна, среди них шесть ранее не известных;
- выявление 4 групп сцепления и детальная схема взаимодействия генов, контролирующего морфологические признаки льна, включающая 6 групп и 5 отдельных генов;
- определение полиморфизма углеводного состава слизи семян у 33 линий и

полисахаридного и белкового состава слизи и ее реологических свойств у 18 линий.

Изучение групп линий контрастных по жирнокислотному составу показало, что из-за резкого снижения синтеза линоленовой кислоты непропорционально меняется соотношение всех жирных кислот в масле. Выявлено, достоверное влияние генотипа и места выращивания на содержание пальмитиновой, олеиновой и линоленовой кислот в масле и его йодное число. Однако по результатам эколого-географических испытаний линий льна показано, что именно погода в год выращивания более значима, чем географические условия. Впервые показана возможность использования рангового критерия U Манна-Уитни для выявления ассоциации морфологических признаков, генотипа и родословной линий с хозяйственно ценными признаками.

Теоретическая и практическая значимость работы заключена в комплексном изучении по морфологическим и хозяйственно ценным признакам 317 линий генколлекции. У 73 из них описан генетический контроль морфологических признаков, а также создано 60 линий – гомозиготных по нескольким генам морфологических признаков. Идентифицированы 3 системы ЦМС и 7 генов восстановителей фертильности и их взаимодействие с морфологическими признаками.

Изучено разнообразие льна по жирно-кислотному составу масла семян и его зависимость от условий среды.

При оценке на искусственном инфекционном фоне выявлено 117 линий высоко устойчивых к ржавчине (*Melampsora lini*). Выявлена связь некоторых морфологических признаков с хозяйственно ценными и определены линии, хорошо передающие полезные для селекции признаки потомкам.

Показано разнообразие по углеводному составу слизи семян льна, которое может послужить для дальнейших исследований хлебопекарных свойств семян, так и связующих свойств слизи при производстве биоразлагаемых композитов.

Разработаны CAPS маркеры для идентификации аллелей гена *LuFAD3A*, контролирующего синтез линоленовой кислоты. Показана возможность использования тест системы, созданной ранее на второй ген *LuFAD3B*, также участвующий в формировании этого признака. С использованием этих маркеров отобраны раннеспелые средне- и низколиноленовые константные гибриды.

Результаты работы прошли широкую апробацию и были представлены на более чем 20 международных и всероссийских съездах, симпозиумах, конгрессах, конференциях. По результатам исследования по теме диссертации опубликована 61 работа, включая

сборники трудов конференций, в том числе 18 статей в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Диссертационная работа Пороховиновой Е.А. изложена на 370 страницах, состоит из введения, трех глав (обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения), заключения, выводов, практических рекомендаций для селекции, списка сокращений, списка литературы и приложения. Диссертация включает 107 таблиц и 46 рисунков высокого качества. Библиографический указатель насчитывает 331 источник, в том числе 158 на русском языке.

Во введение диссертации рассмотрена актуальность представленной темы, характеристика объекта исследований. Сформулированы цель и задачи работы, представлены научная новизна, теоретическое и практическое значение, методология и методы исследования, основные положения, выносимые диссертантом на защиту, места апробации, характеристика публикаций автора, декларация личного вклада соискателя, структура и объем работы.

Первая глава – обзор литературы, который состоит из четырех разделов. В них рассмотрена внутривидовая изменчивость культурного льна, показано, что он в отличие от основных сельскохозяйственных и модельных культур обладает крайне узкой изменчивостью основных признаков. Описаны имеющиеся в мире генетические коллекции льна, формально генетические, молекулярно генетические и биохимические основы формирования морфологических признаков и проведено их сравнение для льна и модельных объектов. Освещены основные направления селекции льна и подробно – те, которые разрабатываются в диссертации (жирнокислотный состав масла семян, биохимический состав слизи их оболочки, устойчивость к ржавчине). Многоплановость представленного материала, способность автора к анализу и обобщению производит очень благоприятное впечатление. Каждый из разделов представленного обзора может быть опубликован в научных журналах в том же качестве.

Во второй главе – материал и методы корректно описан материал генколлекции ВИР, используемый соискателем в работе. Приведены методики создания и полевого изучения линий, оценки устойчивости к ржавчине на искусственном инфекционном фоне, определения биохимического состава семян, выделения и анализа нуклеотидных последовательностей генов. Описаны статистические методы, используемые для обработки данных. Все выполненные автором исследования, проводились с использованием современных методов.

Третья глава посвящена непосредственно результатам и их обсуждению и состоит из шести разделов.

В первом разделе представлены результаты изучения линий по морфологическим признакам, показан широкий полиморфизм по окраске и форме цветка, семян, всего растения, охватывающий все известное разнообразие вида. Описаны общие закономерности сочетания морфологических признаков между собой.

Во втором разделе охарактеризовано разнообразие линий генетической коллекции по хозяйственно ценным признакам (высоты, продолжительность фаз вегетационного периода) и определена связь последних с морфологическими признаками. Среди 363 изученных линий 53 выделились по одному или нескольким хозяйственно ценным признакам. В каждой группе льна, сформированной по морфологическим признакам, выделены линии с минимальными и максимальными значениями количественных признаков. Показано, что некоторые морфологические и хозяйственно ценные признаки связаны между собой, что может облегчить первичный отбор. Выявлены несколько линий, хорошо передающих потомству ценные признаки в процессе гибридизации.

Третий раздел, основной, посвящен идентификации и изучению взаимодействия генов льна формально генетическим анализом. Всего в 216 скрещиваниях между 73 линиями проанализировано наследование 41 гена, из которых 8 имело множественный аллелизм. Также рассмотрено 3 системы ЦМС и 7 генов восстановления фертильности. Из 30 описанных в литературе генов не было изучено только 4. Проведены тесты на аллелизм и доказана аллельность 10 генов линий генколлекции ВИР и линий из других коллекций Нидерландов, Франции, Украины. Впервые описано наследование шести генов. Выявлено 11 пар сцепленных генов, образующих 4 группы сцепления. Представлена схема взаимодействия генов.

Впечатляет способность автора одновременно анализировать большое число признаков. Это, несомненное достоинство переходит в недостаток при отображении результатов в таблицах. Таблицы перенасыщены информацией и сокращениями. Например, нет необходимости в колонке, обозначающей число изученных растений, если рядом даны результаты фактического расщепления. Непонятно зачем приводить фенотипы гибридов F₂ по пяти-шести признакам если расщепление показано для какого-то одного признака (таблицы 28, 29).

В четвертом разделе проведено описание линий генетической коллекции льна по устойчивости к ржавчине (*M. lini*). На выборке из 267 линий, показано, что более трети изученных на инфекционном фоне линий устойчивы к ржавчине. Поскольку в главе Материалы и методы отмечено, что изучение устойчивости в поле проводили в течение 15 лет, то было бы целесообразно привести данные по годам изучения или, хотя бы уточнить, что приведены усредненные многолетние данные. Выявлена тенденция, что линии,

имеющие синие цветки или реснички на перегородках коробочек более устойчивы к этому патогену, чем другие формы. Доказано, что линия гк-132 (л-1 из к-6608, Currong, Австралия) может быть донором устойчивости к ржавчине, так как все линии, в родословной которых она присутствует, были устойчивыми к этому патогену.

Диссертант отмечает наличие коллекции сортов-дифференциаторов, но не приводит их оценку на инфекционном фоне. Данных об эффективности определенных генов устойчивости в условиях проведения оценок на устойчивость как раз и не хватает, чтобы сравнить фенотипы устойчивости испытываемых линий и носителей этих генов. Для некоторых генов устойчивости льна к ржавчине известны молекулярные маркеры, в том числе и SCAR маркеры. В связи с этим было бы целесообразно провести молекулярный скрининг среди выделившихся по устойчивости образцов льна для идентификации генов устойчивости, тем более, что автор владеет такими методами и успешно их применила при разработке CAPS-маркеров для идентификации аллелей гена, контролирующего синтез линоленовой кислоты *LuFAD3A*. Перечисленные проблемы, по-видимому, будут являться направлениями дальнейших исследований.

Пятый раздел посвящен изучению слизи семян льна. В нем на большой выборке линий льна показано все известное разнообразие по моносахаридному составу слизи. На 18 линиях проведено всестороннее изучение 45 признаков: физико-химических свойств слизи семян, размеров семян, скороспелости. Приводятся общие закономерности сочетания этих признаков, как между собой, так и в изученных линиях.

1. Шестой раздел посвящен жирнокислотному составу масла семян льна. В нем подробно описано имеющееся в генколлекции разнообразие льна по биохимическому составу масла, установлено влияние на него среды произрастания льна, показано, что селекция льна на низкое содержание непредельных кислот привела к изменению структуры корреляций между всеми жирными кислотами. Надо отметить что все эти результаты стали возможны только после огромной предварительной работы по созданию низко- и среднелиноленовых линий, большинство из которых были получены автором как в результате отбора из исходных *solin* сортов, так и после гибридизации с ними и дальнейшего инцухта. Соискателем разработаны CAPS-маркеры для идентификации аллелей гена *LuFAD3A*. Установлено, что все имеющиеся в коллекции ВИР низколиноленовые формы, несут мутацию в одном сайте первого экзона этого гена. Показано нестандартное использование разработанной ранее тест системы (Vrinten et al., 2005) для других аллелей второго гена (*LuFAD3B*), контролирующего синтез линоленовой кислоты. На основе разработанных CAPS маркеров, среди скороспелых гибридов были отобраны несколько гомозиготных низко- и среднелиноленовых линий, которые могут

стать основой нового сорта. Следует отметить, что практически все средне- и низколиноленовые линии однородны по аллелям генов *LuFAD3A* и *LuFAD3B*, наверное корректней было бы назвать группы линий по уровню линоленовости более узко. Две линии гк-119 и 163 «выбиваются» из группы среднелиноленовых, так как имеют иное соотношение жирных кислот и это вносит существенное уменьшение степени скоррелированности признаков.

На наш взгляд недостаточна связь между разделами, описывающими хозяйственно ценные признаки. Не хватает заключительного раздела с комплексной характеристикой линий, как по морфологическим, так и по всем описанным в диссертации признакам. Автор в каждом из разделов пытается дополнить выделившиеся линии по другим признакам, но этого не достаточно. В заключительном разделе также было бы важно увидеть модель сорта и соответствующие доноры определенных признаков, обеспечивающие реализацию такой модели.

Заключение

В целом диссертационная работа Е.А. Пороховиновой выполнена на высоком методическом уровне.

Выводы и рекомендации сделаны на основании результатов огромной экспериментальной работы. Автореферат отражает содержание диссертации. Диссертантом создана уникальная генетическая коллекция льна, тщательно охарактеризованная по большому числу морфологических, физиологических, биохимических и генетических признаков. Данная коллекция является базисной при выявлении закономерностей сочетания количественных и качественных признаков, поиску связи легко определяемых признаков с хозяйственно ценными. Автором создан ценный исходный материал для селекции льна, разработаны CAPS- маркеры, контролирующие синтез линоленовой кислоты. Новизна проведенных соискателем научных исследований не вызывает сомнения.

Все это позволяет отметить не только теоретическую значимость проведенных исследований, но и возможность практического использования полученных результатов в селекции. Таким образом, можно констатировать, что диссертантом сделан весомый вклад в решение важной народно-хозяйственной проблемы производства продуктивных сортов прядильной, масличной и зерновой культур льна в Российской Федерации.

Диссертация Е.А. Пороховиновой соответствует специальностям Генетика (03.02.07), и Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений (06.01.05).

По теме диссертации опубликованы 61 работа, в том числе 18 статей в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК РФ.

Диссертационная работа Е.А. Пороховиновой на тему «Генетическая коллекция льна (*Linum usitatissimum* L.): создание, анализ и перспективы использования» является законченной научной работой и отвечает требованиям ВАК РФ «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 №842, а ее автор Пороховинова Елизавета Александровна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.07 – Генетика, 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Афанасенко Ольга Сильвестровна,
доктор биологических наук по специальности 06.01.07 –
Защита растений, профессор, академик РАН, заведующий
лабораторией иммунитета растений к болезням
Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-исследовательский
институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)
Адрес: Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского, д.
3, 196608
Тел. +7 (812) 470-51-10
E-mail: olga.s.afan@gmail.com

Подпись руки *Афанасенко О.С.*

Удостоверяю

Секретарь
директора

Коси

