

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н., проф. **Муравенко Ольги Викторовны** 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.

Актуальность избранной темы

Лен (*Linum usitatissimum* L.) важнейшая сельскохозяйственная культура, продукты переработки которой используются в текстильной, пищевой, химической, фармацевтической и др. промышленности. История генетических исследований этой культуры одна из самых продолжительных. Тем не менее, похромосомная сборка генома льна и консенсусная генетическая карта опубликована в этом году. Насыщение этой карты генами останется важнейшей научной задачей еще не один год.

Небольшое число работ по частной генетике льна и утеря мутантных форм с известным генетическим контролем не позволяет надежно идентифицировать фенотипически близкие сорта льна. Отсутствие эффективной ДНК паспортизации сортов льна требует других критериев оценки сортовой идентичности для различения внешне сходных сортов льна. Соответственно, выявление морфологических признаков льна с простым генетическим контролем представляется особо актуальной проблемой. На решение этой проблемы направлено данное исследование. Диссертационная работа Е.А. Пороховиновой посвящена созданию и изучению генетической коллекции льна по традиционным (морфологические признаки, скороспелость, устойчивость к ржавчине) и по современным направлениям селекции, таким как жирнокислотный состав масла семян или углеводный состав слизи. Создание генетической коллекции самоопыленных линий льна и ее исследование позволят значительно расширить теоретические представления об изменчивости и наследовании признаков, а также существенно обогатить генетическую карту льна. Использование генетической коллекции в качестве исходного материала в селекции новых сортов льна с определенными признаками позволит повысить эффективность отбора и ускорить селекционный процесс, что особенно ценно с практической точки зрения.

Научная новизна

В результате многолетних исследований Е.А. Пороховиновой создана обширная генетическая коллекция, включающая более трехсот самоопыленных линий. Диссертантом в результате формально-генетического анализа из 41 идентифицированного гена, которые контролируют морфологические признаки льна, шесть выявлены впервые. Установлено, что все изученные гены ассоциированы с четырьмя группами сцепления. Впервые предложена детальная схема взаимодействия генов, контролирующих

морфологические признаки льна.

На большой выборке впервые установлены связи между полиморфизмом углеводного и белкового состава слизи семян и ее реологическими свойствами и другими хозяйственно ценными признаками.

Проведенное диссертантом исследование групп линий льна, контрастных по жирнокислотному составу, впервые установило непропорциональную изменчивость соотношения всех жирных кислот в масле при резком снижении синтеза линоленовой кислоты. Кроме того, впервые обнаружено, что погодноклиматические условия выращивания могут быть более значимы для роста и развития растений льна, чем географическая зона. Разработан оригинальный подход к выявлению ассоциации морфологических признаков, генотипа и родословной линий с хозяйственно ценными признаками.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленная диссертационная работа вносит существенный вклад в развитие генетики льна и теоретические основы селекции этой ценной культуры, многоцелевого назначения. Созданная диссертантом обширная коллекция линий льна охватывает практически все известное разнообразие льна по исследуемым признакам.

В результате проведенного комплексного изучения 317 линий генетической коллекции по морфологическим и хозяйственно ценным признакам у 73 линий определен генетический контроль морфологических признаков, и на основе проведенных скрещиваний создано 60 линий – гомозигот по нескольким генам морфологических признаков. Также идентифицированы 3 системы ЦМС и 7 генов восстановителей фертильности и их взаимодействие с морфологическими признаками. Исследование разнообразия льна по жирнокислотному составу масла семян показало его зависимость от условий среды. Из 267 линий, различающихся по морфологическим признакам, выявлено 117 линий полностью устойчивых к ржавчине (*Melampsora lini* (Pers.) Lev). Разработаны молекулярные (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 продемонстрирована возможность успешного отбора низколиноленовых селекционных образцов льна, что открывает новые возможности для ускорения процесса создания новых сортов.

Для селекции также очень важно, что установлены ассоциации некоторых морфологических и хозяйственно ценных признаков льна, а также то, что выделены линии, хорошо передающие полезные для селекции признаки потомкам. Кроме того, для практического применения важно установленное разнообразие по углеводному составу семян льна, которое может послужить для дальнейших исследований хлебопекарных (эмульгирующих) свойств семян и связующих свойств слизи при производстве биоразлагаемых композитов.

Апробация результатов работы. Результаты работы 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 Е.А. Пороховиновой изложена на 370 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций для селекции, списка сокращений, списка литературы и приложения. Библиографический указатель включает 331 источник, из них 158 – в отечественной литературе, а 172 – в зарубежной. Диссертация содержит 107 таблиц и 46 рисунков.

Введение диссертации посвящено рассмотрению актуальности представленной темы, характеристике объекта исследований. Е.А. Пороховиновой четко сформулированы цель и задачи работы, представлены научная новизна, практическое значение, основные положения, выносимые соискателем на защиту, места апробации, характеристика публикаций автора, декларация личного вклада диссертанта, структура и объем работы.

Глава 1. Обзор литературы. Состоит из четырех разделов, рассмотрены внутривидовая изменчивость *L. usitatissimum* L. и существующие в мире генетические коллекции льна, описаны формально генетические, молекулярно-генетические и биохимические основы формирования морфологических признаков как на модельных объектах, так и у льна. Сформулированы основные направления селекции льна и подробно освещены те, которые разрабатываются в диссертации (жирнокислотный состав масла семян, полисахаридный состав слизи их оболочки, устойчивость к ржавчине). В целом представлен достаточно широкий обзор результатов исследований по проблеме, хотя работам 2018-2019 годов по картированию генома льна можно было уделить немного больше внимания. Следует упомянуть также некоторое противоречие. Автор пишет на стр.13 «Вид *Linum usitatissimum* L. ($2n=30$) морфологически и биохимически однороден...», но далее по тексту обзора (стр.38-39, 46 и т.д.) неоднократно противоречит этому утверждению.

Глава 2. Материал и методы. Для исследования диссертантом использован значительный объем линий генколлекции ВИР. Описана методика создания и полевого изучения линий, оценки устойчивости к ржавчине на искусственном инфекционном фоне, биохимические методики определения состава семян, выделения и анализа нуклеотидных последовательностей генов. Подробно описаны статистические методы, используемые для обработки полученных результатов. Выполненные автором фенологические, биометрические, биохимические и молекулярно-генетические исследования, а также комплексная оценка генетической коллекции проводились с использованием как классических, так и современных подходов. Было бы желательно, чтобы диссертант составил приложение, в котором было бы отмечено, по какому из признаков изучалась каждая из линий генколлекции.

Глава 3. Результаты и обсуждение состоит из шести разделов. В разделе 1 представлены результаты изучения линий признаковой коллекции по морфологическим признакам. Диссертантом выявлен широкий полиморфизм по окраске и форме цветка, семян, морфологии растения, охватывающий все известное разнообразие вида. Описаны общие закономерности сочетания морфологических признаков между собой. В разделе много таблиц, часть из которых желательно перенести в приложение для лучшего восприятия обширной информации.

В разделе 2 охарактеризовано разнообразие линий генетической коллекции по хозяйственно ценным признакам (высоты, скороспелость) и определена связь последних с морфологическими признаками. Среди 363 изученных линий 53 были выделены диссертантом по одному или нескольким хозяйственно ценным признакам. В каждой группе льна, сформированной по морфологическим признакам, выделены линии с экстремальными значениями высот растения и продолжительности фаз вегетационного периода, многие из которых перспективны для создания сортов. В результате, Е.А. Пороховиновой установлено, что некоторые морфологические и хозяйственно ценные признаки связаны между собой. Такие ассоциации существенно могут упростить первичный отбор перспективных селекционных образцов. На основании полученных результатов, автором выявлены несколько линий, хорошо передающих потомству ценные признаки в процессе гибридизации.

Третий раздел, самый большой по объему, посвящен идентификации изучению и систематизации взаимодействия генов льна, классическим генетическим анализом. В первую очередь, это касалось генов, контролирующих морфологические признаки, ассоциированные с проявлением хозяйственно ценных признаков. Всего в 216 скрещиваниях между 73 линиями проанализировано наследование 41 гена, из которых 8 имело множественный аллелизм. Доказана аллельность 10 генов линий генколлекции ВИР, а также линий из других коллекций (Т. Tammes, F. Plonka, В. Лях), имеющих сходные фенотипы. Диссертантом впервые описано наследование шести генов. Установлено 11 пар сцепленных генов, относящихся к 4 группам сцепления. Диссертантом составлена схема взаимодействия генов окраски и формы различных частей растения льна, которая состоит из 6 групп и 5 отдельных генов. В этой же главе рассмотрено 3 системы ЦМС и 7 генов восстановления фертильности, что может быть уместно, так как альтернативные аллели этих генов меняют окраску пыльников и часто форму цветка.

В четвертом разделе проведено описание линий генетической коллекции льна по устойчивости к ржавчине (*M. lini*). По своей структуре этот раздел совпадает со вторым, но в нем исследовано 267 линий. Е.А. Пороховиновой установлено, что более трети изученных на инфекционном фоне линий устойчивы к ржавчине. Выявлена тенденция большей устойчивости к ржавчине у линий имеющих реснички на перегородках коробочек, что очень ценно для селекции устойчивых форм.

Пятый раздел посвящен изучению слизи семян льна. Это новое и важное направление в селекции льна, поскольку оно связано с использованием семян льна в

качестве ингредиента в производстве хлеба и биоразлагаемых композитов. Структура этого раздела аналогична разделам 2 и 4. Дополнительно представлено подробное и законченное исследование 45 признаков физико-химических свойств слизи семян, размеров семян, скороспелости у контрастных линий льна. В результате автор выявляет общие закономерности сочетания различных свойств слизи в семенах, как между собой, так и в изученных линиях льна.

В шестом разделе подробно описано имеющееся в генетической коллекции ВИР разнообразие льна по жирнокислотному составу масла семян льна. Диссертантом установлено влияние на вариабельность этого признака в зависимости от условий среды произрастания льна. Продемонстрировано, что температура и влажность в год изучения играют более значимую роль в изменчивости жирнокислотного состава масла, чем географическая зона выращивания. Обнаружено, что селекция льна на низкое содержание непредельных кислот приводит к изменению структуры корреляций между всеми жирными кислотами. Е.А. Пороховиновой сконструированы праймеры, подобраны рестриктазы и разработан протокол эксперимента для идентификации аллелей гена *LuFAD3A*. Установлено, что все имеющиеся в коллекции ВИР низколиноленовые формы, несут мутацию в одном сайте первого экзона этого гена. Разработанная ранее тест-система (Vrinten et al., 2005) для второго гена (*LuFAD3B*), контролирующего синтез линоленовой кислоты, адаптирована для выявления мутаций у других аллелей. На основе разработанных CAPS маркеров, удалось отобрать несколько скороспелых гомозиготных низколиноленовых линий, которые могут стать основой для будущего сорта.

В целом, разработанные диссертантом системы маркеров позволят в дальнейшем проводить целенаправленную маркер-ассоциированную селекцию новых перспективных сортов льна в значительно более короткие сроки.

Заключение

Все замечания, отмеченные в диссертации, не затрагивают сути проведенных исследований и не умаляют общей ценности выполненного комплексного научного труда. В целом диссертационная работа Е.А. Пороховиновой выполнена на высоком методическом уровне. Актуальность и новизна проведенных автором научных исследований не вызывает сомнения. Выводы и рекомендации, сделанные автором, обоснованы и подтверждены экспериментально. Полученные соискателем результаты имеют высокую научную и практическую значимость для генетики и селекции. Опубликованные по теме диссертации 61 работа и автореферат отражают содержание диссертации.

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.

Муравенко Ольга Викторовна,
доктор биологических наук по специальностям 03.01.03 – Молекулярная биология, 03.00.15 – Генетика (03.02.07 по номенклатуре научных специальностей 2009 г.), профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной кариологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгарда» Российской академии наук (ИМБ РАН).

Адрес: Москва, ул. Вавилова д. 32, 119991.

Тел. +7(499)135-23-11.

E-mail: olgmur1@yandex.ru

*Подпись Муравенко О.В. удостоверено
участком секретаря ИМБ РАН
Бочаров А.А.*

