

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Карабициной

Юлии Игоревны «Генетическое разнообразие линий и наследование признака восстановления фертильности пыльцы подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-РЕТ1» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность Актуальность работы в том, что полученные данные дают ценнейшую информацию, как теоретическую так и практическую, для селекции отечественных гетерозисных гибридов подсолнечника, которые в настоящее время составляют лишь треть от используемых в РФ. Дело не только в необходимости обеспечения продовольственной независимости РФ, но и в том, что иностранные гибриды не адаптированы к нашим климатическим и почвенным условиям, а также к имеющимся в каждой области, где сеют подсолнечник, набору разнообразных вредителей (сорняков, насекомых, грибов) и особенностям применяемых технологий. Между тем, по-видимому, подсолнечника нужно будет всё больше – не только как пищевого продукта, но и как перспективного источника биотоплива. Актуален и фундаментальный аспект исследования – ЦМС была открыта у кукурузы, и наиболее изучена она у этого объекта. У подсолнечника она имеет свои особенности, без знания которых её трудно использовать в селекции, между тем генетическое разнообразие линий подсолнечника с ЦМС и восстановителей фертильности пыльцы, как и механизмы взаимодействия ядерных и цитоплазматических генов, мало изучены, и цель диссертации Ю.И.Карабициной – восполнить этот пробел.

Новизна. Большая часть современных промышленных сортов подсолнечника создана на основе одного источника ЦМС – РЕТ1. Однако имеющаяся обширная коллекция таких линий ВИР была почти не изучена генетически. В данной работе большая выборка линий впервые была исследована с помощью молекулярных маркеров, гибридологического и цитологического анализов. Выделены линии, наиболее перспективные по признаку восстановления фертильности, молекулярные маркеры генов *Rf* с высокой диагностической ценностью, в том

числе новые микросателлитные локусы, сцепленные с этими генами. Впервые изучено совместное наследование признака восстановления фертильности пыльцы и молекулярных маркеров генов *Rf1*, *R1*, *Radv*, *Pl5/Pl8*.

Цель и задачи исследований изложены четко и лаконично.

Структура диссертации Диссертационная работа изложена на 134 страницах, содержит 26 таблиц, иллюстрирована 25 рисунками и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов, списка сокращений, списка использованной литературы, включающего 206 источников, в том числе 160 ссылок на иностранном языке и Приложения, включающего 2 рисунка и 6 таблиц.

Глава 1. В Литературном обзоре, занимающем 20 страниц, сначала рассмотрена ЦМС у разных растений, её проявление, признаки, выявленные механизмы и гены, восстанавливающие фертильность пыльцы. Затем, более подробно, обсуждены имеющиеся данные о ЦМС-системах у подсолнечника, в особенности касающиеся генов *Rf* и их молекулярного маркирования. Текст иллюстрирован 3 информативными таблицами, а также рисунками. Материал непростой ввиду наличия разных молекулярных механизмов стерилизации и восстановления фертильности даже у одной культуры, не говоря о разных, изложен хорошо. Отмечены проблемы, по которым имеются противоречивые данные, а также явные пробелы в данных.

Глава 2. Описание материала и методов. Полный список линий с указанием происхождения дан в Таблице 1 Приложения, а в основном тексте есть таблица 4, озаглавленная «Список источников, участвовавших в создании линий генетической коллекции подсолнечника». В последней фигурируют в том числе «Питомник ЦМС (3 линии)» и «гибриды, внутривидовой и межвидовой (19 линий)». Но если посмотреть таблицу 1 приложения, то Питомник ЦМС там действительно обозначен для 3 линий, а вот гибриды упоминаются лишь для 3 линий. Следовало бы к этой таблице дать некоторые пояснения.

На стр. 31 сказано: «Большинство изученных линий созданы в ВИР в результате многолетних исследований (табл. 4).» Но если посмотреть таблицу 1 Приложения, то видно, что более половины линий созданы в других странах, в других местах России, или по ним нет данных. Тем не менее, если половина этих линий –

отечественной разработки, очень важно их изучение, так как иностранные линии могут изучать и другие, а исследование отечественных линий совместно с иностранными дает очень ценную информацию. Я не нашла указаний сколько примерно растений исследовалось из каждой линии при анализе маркеров, хотя, по-видимому, анализировалось несколько, раз выявлялась гетерогенность внутри линий, и есть упоминания, что в тех или иных линиях некоторые маркеры определялись у отдельных растений.

Методы описаны хорошо. Приведены условия выращивания исследованных линий и фиксируемые параметры. В Приложении даны сведения о тепло- и влагообеспечении вегетационных периодов по годам. Охарактеризованы использованные однолокусные маркеры, некоторые из которых разработаны при участии диссертанта. Подробно, с указанием всех необходимых деталей, описаны молекулярно-биологические методы – выделение ДНК, проведение ПЦР, рестрикционного анализа, клонирования фрагментов ДНК. Описаны гибридологический анализ, цитологический анализ фертильности пыльцевых зерен и статистический анализ.

Глава 3. Результаты и обсуждение. Генотипирование проводилось по 15 молекулярным маркерам. Сначала был проведен молекулярный скрининг 95 линий, из которых после исключения линий с выраженной неоднородностью по наличию/отсутствию маркеров отобрано для дальнейшей работы 75 линий восстановителей фертильности при ЦМС РЕТ1 типа. Все линии и, при наличии сведений, место получения и исходные линии, указаны в табл.1 Приложения. Там же приведены результаты анализа по всем маркерам с указанием длины амплифицированного фрагмента.

Маркер *orfH522* позволил дифференцировать все линии по типу цитоплазмы, у более половины фертильных линий она была стерильная, что свидетельствовало о наличии доминантных *Rf* генов. Для определения их аллельного состояния использовали маркеры *SSR*, *STS* и *SCAR*. У ряда линий сведения о паттерне распределения маркеров и типе цитоплазмы понадобилось дополнить результатами анализа тест-скрещиваний, чтобы увереннее судить о наличии доминантного аллеля *Rf1*. У 3 микросателлитных локусов, исследованных с помощью микрочипового электрофореза, был выявлен аллельный полиморфизм

(4-5 аллелей) и присутствие уникальных аллелей у линий сопоставлено с присутствием/отсутствием других маркеров. Фрагменты двух микросателлитных локусов были клонированы и секвенированы, что дало возможность выявить нуклеотидный полиморфизм участков генома изученных линий, важный для оценки генетического разнообразия коллекции.

Специальный раздел посвящен генотипированию с помощью маркеров генов, кодирующих белки PPR, содержащие мотивы из 35 аминокислотных остатков и участвующие в восстановлении фертильности цитоплазмы. Анализ маркеров генов устойчивости к ржавчине и ложной мучнистой росе выявил линии, несущие эти гены, что важно при подборе родительских пар в скрещиваниях.

С учетом полученных данных о паттернах распределения маркеров были подобраны пары для скрещиваний и последующего гибридологического анализа гибридов F1 и F2, с цитологическим исследованием пыльцы. Интересные результаты были получены при изучении пыльцы растений одного гибрида, выращенного в разных климатических зонах, и особенно - связанные с выявленным феноменом «малопыльцовости». Данные по малопыльцовости фертильных растений не поддаются простой интерпретации, и в диссертации рассмотрены несколько гипотетических механизмов, могущих привести к такому результату.

В последней подглаве главы 3 рассматривается диагностическая ценность молекулярных маркеров гена *Rfl* на основании данных полученных в работе с учетом имеющихся в литературе сведений по подсолнечнику и другим культурам. Выявлена сложная картина – ни один из рассмотренных 5 маркеров не обладал 100% эффективностью, а более эффективный митохондриальный маркер *orfH522* применим лишь для линий со стерильной цитоплазмой. Предложена схема взаимной локализации некоторых маркеров и гена *Rfl*. Для некоторых особо важных в селекции линий предложены специфические для них эффективные маркеры, которые детально охарактеризованы.

Линии – восстановители фертильности – важная часть системы ЦМС и, соответственно, коллекции подсолнечника ВИР, и то, что она генотипирована на таком высоком уровне, представляет важное достижение. Работа дает много очень ценных данных для понимания механизмов ЦМС у подсолнечника. Её

практическая значимость тоже несомненна, так как полученные данные о фертильности, характере ЦМС, генетическом разнообразии и группировании изученных линий позволят селекционерам с гораздо большим основанием выбирать линии для их работы с подсолнечником. Для этого часть результатов работы уже вошли в опубликованные с участием диссертантки «Каталог мировой коллекции (раздел «Генетическая коллекция подсолнечника») и «Методические указания»

В диссертации выполнен очень большой объем работы, потребовавшей разнообразного экспериментального мастерства. Налицо стремление к максимально достоверным результатам и их интерпретации – учтены и обсуждены все возможные причины некоторых неоднозначных результатов, проведены дополнительные исследования. Все выводы обоснованы. Диссертация написана хорошим языком, лаконично, с минимумом общих мест.

После внимательного ознакомления с диссертационной работой никаких существенных недостатков мною не было выявлено. В работе даже мало опечаток, хотя непонятно, опечаткой ли является линия ВИР 111А, которая встретилась на стр. 60, но не упоминается в таблице 1 Приложения.

Учитывая актуальность, новизну и объем полученных экспериментальных данных, теоретическую и практическую значимость, диссертационная работа, несмотря на сделанные мелкие замечания, несомненно заслуживает очень высокой оценки. Основное содержание диссертации полно отражено в 5 опубликованных работах в журналах списка ВАК, материал неоднократно доложен на российских и международных конференциях, автореферат соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, представленная к защите кандидатская диссертация Ю.И.Карабициной «Генетическое разнообразие линий и наследование признака восстановления фертильности пыльцы подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-РЕТ1» соответствует критериям, установленным в пунктах 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842, (с

изменениями от 01.10.2018 г.) предъявляемым к диссертациям на соискание
ученой степени кандидата наук, а её автор, Ю.И.Карабицина, заслуживает
присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.02.07 – генетика.

Отзыв представил

Шнеер Виктория Семеновна



доктор биологических наук

ведущий научный сотрудник

Лаборатории Биосистематики и цитологии

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Ботанического института им. В.Л.Комарова Российской академии наук

1 февраля 2021г

Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова д.2

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Ботанический институт им. В.Л.Комарова Российской академии наук

Телефон/факс: (812) 372-54-33

Адрес электронной почты: shneer@binran.ru

Подпись В.С.Шнеер заверяю

Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ Шнеер В.С.
Шнеер В.С. ОК
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук

