

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного  
бюджетного научного  
учреждения «Федеральный научный  
центр «Всероссийский научно-  
исследовательский институт масличных  
культур имени В.С. Пустовойта»,  
кандидат биологических наук  
Трунова М.В.  
«14» января 2021 г.



## ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» на диссертацию КАРАБИЦИНОЙ ЮЛИИ ИГОРЕВНЫ на тему «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 ИССЛЕДОВАНИЙ.** Подсолнечник *Helianthus annuus* L. является одной из основных масличных культур как в России, так и во всем мире. Для производства его семян в настоящее время в основном используют высокопродуктивные гибриды. В селекции подсолнечника используют материнские формы на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). Признак ЦМС реализуется при определенных сочетаниях мутантных митохондриальных генов, возникающих в результате перестроек митохондриального генома, и ядерных генов, называемых генами восстановления фертильности пыльцы *Rf* (*Restoration of fertility*). Эффекты ЦМС супрессируются при включении в генотип функциональных аллелей генов-восстановителей *Rf*. Генетический контроль признака восстановления фертильности пыльцы у растений недостаточно изучен, число идентифицированных генов невелико, а молекулярные механизмы восстановления фертильности не выяснены. Изменчивость признака восстановления фертильности у растений изучена мало.

В семеноводстве гибридов подсолнечника используется преимущественно цитоплазматическая стерильность (ЦМС) РЕТ1-типа. Генетика признака восстановления фертильности пыльцы форм с ЦМС РЕТ1 подсолнечника изучена недостаточно.



В литературе предложен ряд молекулярных маркеров (STS, SCAR, SSR, TRAP), сцепленных с признаком восстановления фертильности пыльцы, однако их диагностическая ценность оценивалась на ограниченном селекционном и генетическом материале и лишь с использованием ассоциативного подхода.

Одна из главных задач селекции гибридов подсолнечника на основе ЦМС заключается в расширении генетического разнообразия родительских линий. В ВИРе создана и в течение многих лет поддерживается генетическая коллекция линий подсолнечника, в составе которой линии ЦМС и восстановители фертильности пыльцы. Но до сих пор генотипы линий по локусам *Rf* не определены, что ограничивает перспективы их использования в селекции. В связи с этим, приобретает актуальность изучение генетического разнообразия перспективных для использования в селекции линий генетической коллекции подсолнечника ВИР по признаку восстановления фертильности пыльцы и изучение наследования данного признака.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА И ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ И РЕЗУЛЬТАТОВ.** Новизна результатов диссертационной работы заключается в том, что её автором впервые с использованием методов молекулярных маркеров, секвенирования ПЦР-фрагментов, гибридологического и цитологического анализов изучено генетическое разнообразие выборки линий коллекции подсолнечника ВИР, различающихся по способности к восстановлению фертильности при ЦМС РЕТ1-типа. По результатам молекулярного анализа определена генетическая структура выборки из 75 линий. Идентифицированы и на молекулярном уровне охарактеризованы новые, не описанные в литературе аллельные варианты микросателлитных локусов ORS224 и ORS511, сцепленных с геном *Rf1*. Впервые определены генотипы по локусу *Rf1* перспективных для использования в селекции семи линий коллекции. Впервые для двудольных растений изучены особенности наследования морфометрических показателей пыльцы при межлинейных скрещиваниях. Впервые на цитологическом уровне охарактеризован признак «малопыльцовости» подсолнечника, проявляющийся с частотой около 9 % у носителей доминантного аллеля гена *Rf1* в расщепляющихся гибридных популяциях F<sub>2</sub>. На материале генетической коллекции подсолнечника ВИР впервые изучено совместное наследование признака восстановления фертильности пыльцы и молекулярных маркеров генов *Rf1*, *R1*, *Radv*, *P15/P18*. Впервые с использованием метода гибридологического анализа выполнена оценка диагностической ценности молекулярных маркеров гена *Rf1* подсолнечника.

**ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ.** Диссертационная работа изложена на 134 страницах печатного текста и состоит из введения, трех глав, заключения, списка сокращений и списка использованной литературы. В работе представлены 25 рисунков и 26 таблиц в основном тексте, а также 1 приложение, включающее 6 таблиц. Список использованных литературных источников включает 206 наименований, из них 160 - иностранных авторов.

**Во введении** обоснована актуальность и показана степень проработки



проблемы, сформулированы цель и задачи исследований, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, их достоверность, методология и методы исследований, сформулированы положения, выносимые на защиту.

**В первой главе** представлен обзор научных литературных источников по признаку ЦМС у растений, природе генов, восстанавливающих фертильность пыльцы у форм с ЦМС, обобщены данные литературы о ЦМС подсолнечника, современных методах изучения генетического контроля признака восстановления фертильности пыльцы и актуальная информация о генетике признака. На основании этого были сформулированы цели и разработана программа исследований.

**Во второй главе** приведены растительный материал и условия вегетации, методы молекулярно-генетического анализа, включающего выделение ДНК, постановку ПЦР, рестрикционный анализ, клонирование фрагментов ДНК, а также гибридологический анализ, цитологический анализ пыльцы и статистическая обработка полученных результатов.

**В третьей главе** представлены результаты по изучению генетического разнообразия перспективных для использования в селекции линий генетической коллекции подсолнечника ВИР по признаку восстановления фертильности пыльцы.

В первом разделе главы представлены результаты генотипирования линий генетической коллекции подсолнечника ВИР с помощью маркеров, ассоциированных с генетической системой ЦМС-Rf, маркеров PPR-генов, молекулярных маркеров генов устойчивости к болезням и структурирование изученной выборки линий на основе данных молекулярного анализа. Это дало возможность по результатам генотипирования на основе 15 ядерных и митохондриального маркерных локусов объединить линии в четыре группы, различающиеся по типу цитоплазмы, а также по сочетаниям маркерных фрагментов (аллелей).

Во втором разделе главы приводятся данные о наследовании признака восстановления фертильности пыльцы в межлинейных скрещиваниях. Показано, что линии-восстановители фертильности пыльцы ВИР 195, ВИР 210, ВИР 365, ВИР 558, ВИР 740, RIL 80 и RIL 130, различающиеся по типу цитоплазмы и наличию диагностических маркеров гена *Rf1*, в том числе уникальных аллелей микросателлитных локусов, несут доминантный аллель гена *Rf1*, широко используемый в гибридной селекции. В F<sub>2</sub> от скрещивания этих линий со стерильной линией ВИР 116А (РЕТ1) восстановление фертильности наследуется как моногенный признак. Гены восстановления фертильности линии ВИР 365, не имеющей большинства диагностических маркеров гена *Rf1* и линии RIL130 – аллельны.

Третий раздел посвящён особенностям наследования морфометрических параметров пыльцы при межлинейных скрещиваниях. Дана цитологическая характеристика пыльцы отцовских линий, пыльцы F<sub>1</sub> межлинейных гибридов и оценена изменчивость признака восстановления фертильности пыльцы в



расщепляющихся гибридных популяциях. Показано, что уровень фертильности пыльцы растений  $F_2$  составляет более 80 %; морфометрические параметры ПЗ варьируют в более широких пределах, чем у растений  $F_1$ . Около 9 % растений  $F_2$  от скрещивания стерильной линии с линиями-восстановителями продуцируют небольшое количество пыльцы и классифицируются как «малопыльцовые». Их пыльца имеет пониженную частоту фертильных ПЗ по сравнению с высокофертильными растениями и содержит больше аномальных ПЗ, чем у растений с нормальной фертильностью.

В четвёртом разделе представлены данные о диагностической ценности молекулярных маркеров гена *Rf1*. Автором изучено совместное наследование признака восстановления фертильности пыльцы и ряда молекулярных маркеров, локализованных в группе сцепления 13. Для большинства используемых в исследовании локусов обнаружили сцепленное наследование с признаком восстановления фертильности пыльцы. В качестве наиболее эффективных для маркеропосредованного отбора из расщепляющихся гибридных популяций были предложены маркеры ORS511, HRG01 и HRG02.

**СТЕПЕНЬ ОБОСНОВАННОСТИ И ДОСТОВЕРНОСТИ ВЫВОДОВ И РЕЗУЛЬТАТОВ.** В целом, представленная работа является завершённым научным исследованием. Рассматривая представленный в диссертационной работе экспериментальный материал, можно отметить, что выдвигаемые на защиту положения имеют достаточную обоснованность. Исследования проводились с применением апробированных современных методик, стандартных методов математического анализа. Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, достаточно полно изложены и научно обоснованы, и вытекают из проведённых исследований. Диссертация написана хорошим литературным языком.

Таким образом, достоверность полученных результатов исследований не вызывает сомнений.

**АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.** Материалы диссертации были доложены или представлены на всероссийских и международных научно-практических конференциях конгрессах и совещаниях, в том числе: Международной научной конференции, посвященной 120-летию основания Федерального исследовательского центра Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова «Генетические ресурсы растений – основа продовольственной безопасности и повышения качества жизни» (Санкт-Петербург, 2014); X Международном конгрессе генетиков и селекционеров (Молдавия, 2015); V Международной школе для молодых ученых, посвященной памяти члена-корреспондента РАН, профессора Т. Б. Батыгиной «Эмбриология, генетика, биотехнология» (Санкт-Петербург, 2016); Научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Годичное собрание общества физиологов растений России. Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 2016); II



Международной конференции, посвященной 80-летию СИБНИИРС «Генофонд и селекция растений» (Новосибирск, 2016); Международных научно-практических конференциях молодых учёных «Роль молодых ученых в решении актуальных задач АПК» (Санкт-Петербург, 2017, 2018); IV Вавиловской международной конференции «Идеи Н. И. Вавилова в современном мире» (Санкт-Петербург, 2017); 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Г. С. Муромцева «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019); Международной конференции «125 лет прикладной ботаники в России» (Санкт-Петербург, 2019).

**ПОЛНОТА ПУБЛИКАЦИИ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ В НАУЧНОЙ ПЕЧАТИ.** Автором было опубликовано 5 научных статей в изданиях, рекомендованных ВАК и 14 научных работ в других изданиях.

**ЗНАЧИМОСТЬ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ** состоит в том, что на основании результатов лабораторных и полевых опытов даны научно обоснованные рекомендации по использованию полученных данных для идентификации доминантного аллеля *Rf1* в генотипах линий.

**Теоретическая значимость** работы заключается в том, что полученные новые знания об изменчивости и характере наследования признака восстановления фертильности пыльцы вносят вклад в выяснение природы супрессии фенотипа ЦМС РЕТ1 у подсолнечника, а также могут быть использованы для понимания генетических механизмов этого признака у других растений. Данные генотипирования выборки линий коллекции подсолнечника ВИР, информация об аллельной изменчивости сцепленных с геном *Rf1* микросателлитных локусов, уточненные данные о генетических расстояниях между локусами молекулярных маркеров группы сцепления 13, несущей гены для ряда хозяйственно ценных признаков (восстановление фертильности пыльцы, устойчивость к возбудителю ржавчины и ложной мучнистой росы) и локусом *Rf1* расширяют существующие представления об изменчивости генома вида *H. annuus*.

**Практическая значимость** работы обусловлена тем, сведения о структуре генотипического разнообразия изученной выборки линий коллекции ВИР могут быть полезны при планировании генетических экспериментов и работах по созданию нового исходного селекционного материала для гетерозисной селекции подсолнечника. Молекулярные маркеры, валидированные в ходе исследования, перспективны для идентификации доминантного аллеля *Rf1* в генотипах линий генетической коллекции ВИР, а также гибридов, полученных с их участием.

**РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДОВ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ.** Полученные автором результаты и сделанные на их основании выводы могут быть использованы для увеличения эффективности селекционного процесса гибридного подсолнечника. Молекулярные маркеры, валидированные в ходе исследования дадут возможность идентифицировать



доминантный аллель *Rf1* в генотипах линий и гибридов, полученных с их участием. В семеноводстве гибридного подсолнечника применение данных молекулярных маркеров для анализа партий семян стерильных материнских линий гибридов даст возможность определять уровень их засоренности семенами фертильных форм.

Рассматривая диссертационную работу в целом, можно констатировать, что тема её соответствует заявленной научной специальности. Полученные в результате исследований экспериментальные данные всесторонне анализированы, аргументировано, последовательно и профессионально изложены, легко читаются и соответствуют поставленным целям и задачам. Все экспериментальные данные обработаны с использованием соответствующих методов статистического анализа. Содержание диссертации достаточно полно отражено в автореферате и в опубликованных научных работах.

Оценивая в целом положительно диссертационную работу Карабициной Юлии Игоревны, считаем необходимым отметить следующие недостатки:

### **ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ И АВТОРЕФЕРАТУ**

1. В тексте диссертации и автореферата встречается использование символов обозначений процента «%» и градуса Цельсия «°C», в нарушение ГОСТ 8.417-2002, п.8, без обязательного пробела после цифровых значений - «10%» вместо «10 %», или «20°C», вместо «20 °C». Например, на стр. 32, 33, 34, 35, 36, 37, 43, 45, 50 и др.

2. На стр. 59 рис.15 ошибочно описан как рис.13.

3. В таблице 12 для лучшего восприятия информации следовало обозначить наличие генов устойчивости у исследованных линий.

4. На стр. 68 указано, что «Данные анализа морфометрических параметров пыльцы отцовских линий и гибридов приведены в разделе «Цитологический анализ пыльцы». Но этот раздел в диссертации относится к главе «Материалы и методы» и экспериментальных данных не содержит.

5. На стр. 82 вместо HRG02 написано HRG01.

6. В табл. 25 для расщепляющихся пар локусов *Rf1* с SCX20 и *Rf1* с SCT06  $\chi^2$  у некоторых комбинаций скрещивания превышает допустимые для независимого наследования генов ( 38,4 и 64,8 соответственно). Следовало бы объяснить причины искажения расщепления.

7. В диссертации приведена теоретическая и практическая значимость работы, но нет раздела рекомендации по использованию результатов и выводов для практики.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ**

Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.02.07 – генетика. Автореферат и научные публикации соответствуют содержанию диссертации. Выказанные замечания и пожелания не имеют принципиального значения и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Диссертация Карабициной Юлии Игоревны на тему «Генетическое разнообразие линий и наследование признака восстановления фертильности пыльцы

подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-РЕТ1», представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, которая по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, объёму выполненной работы, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней» (постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а автор Карабицина Юлия Игоревна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Отзыв на диссертацию Карабициной Юлии Игоревны на тему «Генетическое разнообразие линий и наследование признака восстановления фертильности пыльцы подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при ЦМС-РЕТ1» рассмотрен и одобрен на расширенном заседании отдела биологических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» протокол № 1 от 14 января 2021 г.

Заведующий лабораторией

молекулярно-генетических исследований отдела биологических исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта» (ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК), ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, специальность 03.02.07 (03.00.15)

Саида Заурбиевна Гучетль

Подпись Саиды Заурбиевны Гучетль

удостоверяю: учёный секретарь  
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК,  
кандидат биологических наук



М.В. Захарова

350038, г. Краснодар, ул. Филатова, д. 17

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта», телефон 8(861)275-78-45; факс 8(861)254-27-80, e-mail: vniimk@vniimk.ru