

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н., проф., академика РАН Афанасенко Ольги Сильвестровны на диссертацию В. Н. Корзуна «Разработка и применение геномных технологий для молекулярно-генетического карттирования и прикладной селекции зерновых культур», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.07 Генетика и 06.01.05 - Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

Разработка геномных технологий, является приоритетным направлением развития мировой науки. В Российской Федерации геномные технологии имеют статус критических. Поэтому актуальность исследований В. Н. Корзуна, посвященных разработке и применению геномных технологий, как для решения фундаментальных проблем по структурной и функциональной организации геномов основных зерновых культур, так и для разработки новых инновационных подходов в практической селекции не вызывает сомнений. Кроме того, значительная часть диссертационной работы посвящена изучению возможности использования, разработанных автором молекулярных маркеров, для анализа генетических ресурсов устойчивости зерновых культур к облигатным и гемибиотрофным возбудителям вредоносных заболеваний пшеницы, ржи и ячменя. Поскольку во всем мире остро стоит проблема расширения возделывания устойчивых к патогенам сортов сельскохозяйственных культур, обеспечивающих ресурсосбережение и снижение пестицидной нагрузки, то разработка методов молекулярной селекции, позволяющих значительно повысить эффективность селекции на устойчивость с.-х. культур к вредоносным болезням, безусловно, является актуальной задачей.

В условиях изменяющегося климата и возникающих в последнее время экстремальных погодных условий особое значение приобретает

изучение устойчивости с.-х. растений к абиотическим факторам среды - низкотемпературному и осмотическому стрессам и засухоустойчивости. В связи с этим актуальными являются исследования В. Н. Корзуна, связанные с разработкой молекулярно-генетических маркеров для анализа устойчивости зерновых культур к абиотическим стрессам.

Целью диссертационного исследования В. Н. Корзуна являлось создание инновационных молекулярно-генетических технологий и их использование для генетического картирования хозяйственно-ценных признаков, изучения генетических ресурсов, эффективной оценки и отбора селекционного материала для создания перспективных сортов и гибридов зерновых культур.

Поставленные задачи адекватны объявленной цели. Каждая задача включает многоплановые, наукоемкие исследования, в полной мере, представленные в результатах экспериментальной части диссертации. Поскольку автор работал с тремя основными зерновыми культурами – мягкой пшеницей, рожью и ячменем, создавал генетические карты, изучал структурно-функциональную организацию геномов этих культур, разрабатывал молекулярные маркеры устойчивости к десяти патогенам зерновых культур и некоторым абиотическим стрессам, то формулировка 3-х задач кажется чересчур лаконичной.

Научная новизна. В. Н. Корзуном получены приоритетные результаты мирового уровня, которые являются основой для дальнейшего развития исследований в области геномики растений и созданию генетических коллекций зерновых культур.

С его участием созданы молекулярно-генетические технологии и молекулярные маркерные карты для выявления ассоциаций генотип – фенотип, установления структурно-функциональной организации геномов и решения практических задач в селекции основных зерновых культур.

В. Н. Корзун участвовал в создании первой наиболее полной генетической карты мягкой пшеницы, с использованием SSR маркеров, которая явилась основой для молекулярно-генетического картирования у пшеницы. Статья, опубликованная по результатам этой работы в журнале *Genetics* (Röder, Korzun et al. 1998) имеет более 2200 научных цитирований.

В. Н. Корзун участвовал в работе по расшифровке генома *Secale cereale* L. и созданию первого масштабного SNPs чипа для этой культуры. Впервые был реализован инновационный подход по картированию генов и определению генов восстановления фертильности у озимой ржи, на которые были получены 3 патента.

Диссертантом впервые научно обоснован метод геномной селекции для отбора генотипов ячменя по пивоваренным качествам. Разработанные им технологии геномной селекции непосредственно используются в практической селекции зерновых культур.

Приоритетное значение имеют результаты разработанных молекулярных маркеров (ММ) ключевых генов для анализа генетических ресурсов устойчивости зерновых культур к облигатным (стеблевая и бурая ржавчина, мучнистая роса, возбудители вирусных болезней SBCMV и WSSMV) и гемибиотрофным патогенам (фузариоз колоса, септориоз, Церкоспореллэз, пиренофороз, спорынья ржи), приведенных в главе 4 «Применение методов молекулярной генетики для решения проблемы устойчивости зерновых культур к болезням».

Отличительной особенностью диссертационной работы В. Н. Корзуна является гармоничное сочетания фундаментальных исследований по структурной и функциональной организации геномов зерновых культур и использование полученных результатов в практической селекции.

Обзор современной литературы, представленный как в отдельной главе, так и предваряющий каждый раздел экспериментальных глав обобщает 1365 источников, что является несомненным достижением



диссертанта. По-видимому, публикация такого обзора на русском языке была бы чрезвычайно полезна для студентов и научных сотрудников, работающих в данном направлении.

Диссидентом продемонстрирована эффективность созданных молекулярно-генетических технологий и маркерных систем для выявления механизмов устойчивости зерновых культур к биотическим и абиотическим факторам среды. По объему проведенных исследований, с использованием современных геномных технологий и по значимости полученных результатов одна эта глава могла бы быть представлена как полноценная докторская диссертация. Наличие огромного экспериментального материала, которое может быть оценено как несомненное достоинство работы, одновременно явилось недостатком, выражаящимся в чрезмерной лаконичности отдельных разделов диссертации. Поскольку все результаты, полученные при выполнении данного исследования, опубликованы в высокорейтинговых журналах (Q1 и Q2), то очевидно, что они были в полной мере представлены в этих работах и сделанные выводы являются достоверными.

Для разработки ММ локусов устойчивости зерновых культур к патогенам использованы как дву-родительские картирующие дигаплоидные популяции и инбредные линии, так и обширные коллекции пшеницы, в которых проведено ассоциативное картирование (GWAS).

Очень интересные результаты получены диссидентом при изучении генетики признака устойчивости пшеницы к фузариозу колоса. Проведена огромная экспериментальная работа по ассоциативному картированию QTL устойчивости к *F. culmorum* и *F. graminearum*, с использованием SSR маркеров, а также 9k и 90k SNP чипов. Экспериментальные выборки, в трех разновременных исследованиях составляли 455, 372 и 356 генотипов *Triticum aestivum* L. Фенотипирование проведено в различных географических регионах. Выявленные в результате этих исследований ассоциации маркер – признак устойчивости к возбудителю и к накоплению

DON были подтверждены анализом дигаплоидных и инбредных популяций. Большое значение для практической селекции при пирамидировании QTL устойчивости имеют результаты, полученные доктором по определению наличия трёх QTL, в различных комбинациях, от 2-х известных доноров (линия Sumai 3 / Thornbird и сорт Frontana) на экспрессию признака устойчивости к фузариозу колоса. Наибольший положительный эффект по содержанию DON и поражению фузариозом колоса оказали локусы на хромосомах 3B и 5A, а QTL от сорта Frontana, в сочетании с другими QTL не влиял на повышение устойчивости к болезни.

Как справедливо отметил доктор, GWAS является общим подходом к выявлению ассоциаций маркер-признак устойчивости к фузариозу колоса на пшенице, хотя проверка обнаруженных ассоциаций производится крайне редко. В связи с этим большое значение для практической селекции имеют результаты валидации 14 маркеров, сцепленных с девятью QTL устойчивости к фузариозу колоса, выявленных в коллекции из 356 сортов пшеницы «GABI» и последующая частичная проверка результатов в дигаплоидной популяции. Автор продемонстрировал, что выявленные маркеры, являются пригодными для использования в селекции пшеницы на устойчивость к фузариозу колоса. В этом эксперименте также выявлено сцепление с признаком устойчивости к фузариозу колоса пшеницы маркеров, сцепленных с генами *Dicer1* и *AraB*. На основании проведенных исследований автор сделал вывод, что возможен отбор линий с улучшенным уровнем устойчивости к фузариозу, обусловленной, например, QTL «*Qfhs.ifa-5A*», и высоким уровнем урожайности, как исходный родительский сорт.

Выявлены локусы, контролирующие устойчивость к септориозу у европейской озимой пшеницы, показано что, каждый локус имеет небольшой, но значимый аддитивный эффект.

Если, по мнению автора, реализация геномной селекции (GS) по устойчивости к фузариозу колоса является перспективной, то по

устойчивости к септориозу (STB) геномным отбором не удалось улучшить признак устойчивости. Этот вывод был обоснован проведением GWAS в коллекции из 358 озимых и 14 яровых сортов пшеницы и более 2000 гибридных линий и родительских компонентов. Такой результат свидетельствует о необходимости поиска и использования в селекции новых доноров неспецифической устойчивости к возбудителю септориоза.

Большое значение имеет надежность выявленных в различных исследованиях ММ для использования в практической селекции. Этой проблеме был посвящен раздел диссертации 3.2.3 «Стеблевая и бурая ржавчина». В частности, показана надежность использования STS маркеров генов устойчивости *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr35* и маркера SSR для *Lr39*; разработан SNP маркер для конкурентного аллельспецифического анализа генотипирования полимеразной цепной реакции (KASP) гена *Sr3*, детерминирующего устойчивость к стеблевой ржавчине ржи. Показано, что ген *Sr3* и дополнительно выявленные QTL имеют высокий потенциал для использования в селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине ржи. Идентифицировано 11 генов ячменя, контролирующих расонеспецифическую устойчивость к мучнистой росе в присутствии гена *Mlo*, показана особая важность гена, кодирующего транскрипционный фактор WRKY2.

Болезни, вызываемые широко специализированными гемибиотрофными патогенами отличаются высокой вредоносностью, но традиционно являются наиболее сложными для селекции. Устойчивость к этим возбудителям проявляется как количественный признак и отборы по фенотипу затруднены в связи со сложностями создания инфекционных фонов и значительным влиянием условий среды на проявление болезни. В связи с этим разработка молекулярных маркеров устойчивости к таким заболеваниям имеет чрезвычайно важное значение для повышения эффективности селекции.

В. Н. Корзуном, с использованием технологии ассоциативного картирования в коллекции из 168 сортов озимой пшеницы были выявлены новые QTL устойчивости к возбудителю церкоспорилёза и сцепленные с ними ММ. Картирование в дигаплоидных популяциях позволило определить новые ММ тесно сцепленные с известным геном устойчивости Pch1 и показать эффективность их использования на большой выборке сортов озимой пшеницы в маркерной селекции.

Также с использованием технологии GWAS проведено изучение генетики устойчивости пшеницы к пиренофорозу. Выявлено 90 существенных ассоциаций маркер – признак и определены, как известные гены устойчивости, так и новые локусы. Диссертантом обосновано применение геномного отбора в качестве возможной стратегии селекции пшеницы на устойчивость к пиренофорозу.

Впервые были картированы QTLs устойчивости ржи к вирусам мозаики (*SBCMV*) и веретеновидной полосатой мозаики (*WSSMV*). Полученные результаты открывают перспективу для успешной селекции на устойчивость к этим заболеваниям.

Имеющиеся в литературе данные и результаты экспериментальной работы по картированию генов и QTL устойчивости к основным болезням зерновых культур составляют основу методологии дальнейшего углубленного изучения структурной и функциональной организации геномов зерновых культур и клонирования генов устойчивости. Разработанные ММ зерновых культур имеют огромный потенциал для повышения эффективности селекции зерновых культур на устойчивость к болезням.

В. Н. Корзуном экспериментально обоснован вклад геномных технологий и технологий молекулярного маркирования в практику для создания новых сортов и селекционных линий пшеницы, ржи и ячменя. Проведено картирование и определены гены-кандидаты хозяйствственно-важных признаков, получен генетический материал гибридной ржи с геном

восстановления фертильности пыльцы *Rfp1* с существенным уменьшением поражения колоса спорынью, на который оформлено 3 патентных заявки.

Из недостатков работы отмечу большое количество стилистических ошибок и вольное использование специальных терминов («двуходительских картографических популяциях», стр. 87; «Причинными возбудителями церкоспореллоза», стр. 101 и др.), связанных, по-видимому, с переводом с английского, использованных в работе научных статей. Также слишком лаконичное представление экспериментального материала, которое связано с невозможностью втиснуть в рамки диссертации огромный объем экспериментальных исследований.

Заключение

На основании результатов огромной, многоплановой экспериментальной работы В. Н. Корзуном созданы инновационные молекулярно-генетические технологии и молекулярные маркерные системы для функциональной геномики и решения практических задач в селекции пшеницы, ржи и ячменя, включающих анализ генетических ресурсов по устойчивости к абио- и биотическим факторам среды, продуктивности и качества зерна. Полученные результаты являются достижением мировой науки и вместе с эффективным использованием уже имеющихся знаний могут быть использованы в любой отдельно взятой стране, в том числе и России. Можно также констатировать, что полученные диссидентом результаты являются базовыми для дальнейшего развития геномных и пост геномных технологий.

В. Н. Корзун является известным в мировой науке генетиком, стоящим у истоков первых геномных исследований зерновых культур. В последующем, на каждом временном этапе, он не только использовал накопленный мировым научным сообществом опыт, но и сам являлся разработчиком новых геномных технологий.

В любом серьезном исследовании по проблемам геномики объединяют компетенции специалисты разного профиля: генетики, биоинформатики, фитопатологи, физиологи. Наукоёмкость исследований определяет большой авторский коллектив. В связи с этим, все представленные в списке опубликованные работы выполнены в соавторстве. Личный вклад автора состоит в обосновании концепции диссертационной работы и непосредственном участии в выработке рабочих гипотез, получении экспериментальных результатов анализе полученного материала, подготовке к печати научных публикаций, которые использовались в представленной диссертации. Основные положения и выводы диссертационной работы сформулированы автором.

По теме диссертации опубликованы 6 коллективных монографий, 115 статей в высокорейтинговых журналах первого и второго квартилей (80% - Q1 и 20% - Q2), таких как Nature Genetics, Science Advance, Plant Journal, Theoretical and Applied Genetics, Genome, Frontiers in Plant Science, Molecular Breeding, BMC Genomics, BMC Genetics, PLoS ONE, Plant Breeding, Euphytica и других.

Работа прошла широкую апробацию на 115 международных научных конференциях, преимущественно в форме пленарных и секционных докладов (опубликовано более 400 тезисов докладов).

Диссертация В. Н. Корзуня соответствует специальностям Генетика (03.02.07), и Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений (06.01.05).

Автореферат отражает содержание диссертации.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа В. Н. Корзуня на тему «Разработка и применение геномных технологий для молекулярно-генетического картирования и прикладной селекции зерновых культур» является законченной научной работой и отвечает требованиям ВАК РФ «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 №842, а ее автор Виктор Николаевич Корзун, безусловно, заслуживает

присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.07 – Генетика и 06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

Афанасенко Ольга Сильвестровна,
доктор биологических наук по
специальности 06.01.07 – Защита растений,
профессор, академик РАН, заведующая
лабораторией иммунитета растений к
болезням Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-
исследовательский институт защиты
растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Адрес: Санкт-Петербург, г. Пушкин,
ш. Подбелльского, д. 3, 196608
Тел. +7 (812) 470-51-10
E-mail: olga.s.afan@gmail.com

Подпись руки Афанасенко О.С.

Удостоверяю

Секретарь
директора

