

УТВЕРЖДАЮ
Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
А.А.Федянин



«01/09» 2019 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Гультяевой Елены Ивановны по теме «Генетическая структура популяций *Puccinia triticina* в России и ее изменчивость под влиянием растения-хозяина», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.12 – Микология

Актуальность. Работа посвящена изучению *Puccinia triticina* - опасного фитопатогена, вызывающего заболевание пшеницы – бурую ржавчину. Возбудитель бурой ржавчины пшеницы широко распространен, быстро эволюционирует, что позволяет ему успешно преодолевать иммунитет к нему растений. Поэтому создание устойчивых сортов пшеницы невозможно без изучения популяций фитопатогена, их расового и генотипического состава, выяснения роли растений-хозяев в модификациях структуры популяций *Puccinia triticina*. При этом решение этих вопросов должно базироваться на комплексе подходов, традиционных для фитопатологии и современных молекулярно-генетических, что и делается в рецензируемой работе. Рассматриваемая диссертация полностью соответствует специальности микология.

Целью работы было охарактеризовать генетическую структуру популяций возбудителя бурой ржавчины на территории России и оценить влияние растений-хозяев на ее изменчивость.

Научная новизна. Впервые в России с использованием анализа вирулентности и современных молекулярно-генетических методов (RAPD, SNP, УП-ПЦР, SSR) проведен комплексный анализ изолятов *P. triticina*, выделенных в 9 регионах РФ (Европейской части, Урала, Северного Кавказа, Западной Сибири) и Северного Казахстана с разных растений хозяев (нескольких сотен сортов озимой и яровой пшеницы, видах-родичах пшеницы). Определена представленность сортов пшеницы с разными типами устойчивости к бурой ржавчине в регионах РФ. Общим в изменчивости фенотипического состава популяций патогена во всех регионах в 2010-2017 гг по сравнению с предыдущим десятилетием явилась замена фенотипов группы F- на P- M-, в азиатской популяции обнаружено появление и рост новых фенотипов TQ- и TL-, с вирулентностью к Lr9. Установлено высокое генотипическое разнообразие дагестанской популяции *P. triticina*. Охарактеризованы микроэволюционные процессы в популяциях *P. triticina* на территории России в 2010-2017 гг.. Основным фактором микроэволюции популяций патогена является изменчивость под влиянием растения-хозяина. Установлен интенсивный генный поток между кавказской и европейской популяциями *P. triticina* и слабый – между азиатской и европейской.

Теоретическая и практическая значимость работы. С использованием фенотипических и генетических маркеров исследована структура популяций бурой

ржавчины пшеницы в России, определено распространение вирулентных и агрессивных штаммов. Исследованы сорта и селекционный материал пшеницы на наличие *Lr*-генов, установлены перспективные сочетания *Lr*-генов для получения устойчивых сортов пшеницы. Помимо этих значимых для науки результатов, для производства важны следующие достижения автора. Высокая устойчивость к бурой ржавчине отмечена у 3% озимых сортов и 25% яровых мягкой пшеницы из Госреестр 2006-2011 гг.. Установлено, что более 20% яровых сортов обладают ювенильной устойчивостью. У большинства устойчивых в поле озимых сортов выявлены сочетания малоэффективных генов и гена частичной устойчивости *Lr34*. Проведена валидация молекулярных маркеров *Lr*-генов и отобраны наиболее информативные. Результаты, полученные автором, используются в работе специалистов по селекции и защите растений, в научных исследованиях и в образовательном процессе при подготовке студентов по специальностям: «Защита растений», «Фитоиммунитет». При активном участии автора создано 7 сортов пшеницы с высокой устойчивостью к бурой ржавчине.

Публикации диссертанта. По материалам диссертации опубликовано 111 научных работ, из них 51 – в журналах, входящих в перечень международных реферативных баз данных и список ВАК, 17 – статьи в других журналах, монографии и главы в коллективных монографиях, 43 – материалы конференций. Основные результаты работы представлены на 16 российских и 9 международных конференциях.

Личное участие автора в получении результатов диссертации. Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при её непосредственном участии. Автору принадлежит теоретическое обоснование и постановка проблемы, разработка программы исследований, научное руководство и непосредственное участие в проведении экспериментов, в том числе сбор полевых материалов и их лабораторный анализ, статистическая обработка экспериментального материала. Изложенные в работе положения сопровождаются табличным и графическим материалом, обработанным статистическими методами.

Основное содержание работы. Работа состоит из «Введения», «Обзора литературы» (глава 1), «Материалов и методов исследования» (глава 2), 5-ти глав, посвященных результатам и их обсуждению, главы 8, в которой дается характеристика микроэволюционных процессов в российских популяциях *P. triticina*, и представлено заключение по проведенным исследованиям, и выводов, списка литературы и сокращений, 3-х приложений. Список цитированной литературы включает 453 источника, в том числе 231 иностранную работу.

Во **введении** обоснована актуальность темы, представлены цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

В **обзоре литературы** представлены основные достижения популяционно-генетических исследований возбудителя бурой ржавчины пшеницы в России и за рубежом. Описаны биологические особенности *P. triticina*, проанализирована история изучения патогена по вирулентности и ДНК-маркерам, обсуждены преимущества и недостатки различных подходов, используемых при изучении структуры популяций.

В **главе 2** описаны материалы и методы исследований. Инфекционный материал с мягкой пшеницы был собран в 9 регионах РФ в 2001-2017 годах с видов *Triticum* и *Aegilops*. Изучение устойчивости к бурой ржавчине и идентификацию *Lr*-генов провели у 294 сортов озимой и 213 яровой мягкой пшеницы, включенных в Государственный реестр селекционных достижений. Подробно описаны такие методы изучения структуры популяций *Puccinia triticina*, как анализ вирулентности и полиморфизма ДНК. Проведена статистическая обработка результатов популяционных исследований. Отдельный раздел посвящен методам оценки влияния сортов пшеницы на изменчивость популяций *P. triticina*. Подробно описаны фитопатологические подходы определения устойчивости пшеницы, использование ДНК-маркеров для

идентификации *Lr*-генов у сортов пшеницы. Все методы описаны достаточно подробно, позволяют их проанализировать и повторить с их применением эксперименты.

Результаты и их обсуждение приведены в главах с 3 по 7. В **главе 3** представлены результаты исследования структуры популяций возбудителя бурой ржавчины на мягкой пшенице в России по фенотипическому составу. Отдельно приводятся результаты анализа фенотипического состава популяций в Центрально-европейском, Уральском, Западно-сибирском регионах РФ, в Поволжье и на Северном Кавказе. Всего в 2001–2017 гг. изучено 4927 монопустульных изолятов гриба. С использованием 20 *TcLr*-линий определено 329 фенотипов, среди которых 105 были представлены в двух и более регионах или в одном регионе в течение нескольких лет, а остальные были оригинальными и отмечались единично. Показано, что северокавказские и поволжские популяции были более сходны с центрально-европейскими, но отличались от дагестанских и азиатских.

В **главе 4** приведены результаты изучения структуры популяций возбудителя бурой ржавчины на мягкой пшенице по полиморфизму ДНК. Проанализировано 417 монопустульных изолятов по RAPD и УП ПЦР полиморфизму. Выявлен 71 молекулярный фенотип. Один общий RAPD фенотип обнаружен во всех популяциях с разной частотой (от 5% в Центральном регионе до 54% в СевероКавказском). В микросателлитном анализе (SSR) использовали 226 монопустульных изолятов, у которых оценили вариабельность 18 локусов и выявили 48 полиморфных аллелей. Было определено 69 генотипов, 31 из них отмечен в двух и более регионах. Высокое число сходных генотипов определено среди северо-западных, центрально-европейских, волжских и северокавказских изолятов, а также среди западносибирских, уральских и казахстанских (15 и 7 соответственно). SSR-анализ подтвердил дифференциацию российских популяций *P. triticina* на группы по географическому происхождению (азиатские и европейские). В отдельную группу выделились северокавказские изоляты.

В **главе 5** приведены результаты оценки вирулентности и молекулярно-генетической структуры популяций *P. triticina* на видах пшеницы и эгилопса, проведенные как по маркерам вирулентности, так и методами SNP и SSR. При анализе полиморфизма микросателлитных локусов в 2014 г. использовали 181 монопустульный изолят, полученный с 17 видов *Triticum* и *Aegilops*. С использованием 18 SSR-маркеров определено 45 полиморфных аллелей и 41 генотип. Существенные различия по вирулентности и микросателлитным локусам отмечены между изолятами дагестанской популяции с гексаплоидных и тетраплоидных видов *T. durum*, *T. polonicum* и *T. persicum*, что указывает на существование генетически различающихся групп изолятов *P. triticina*. Для SNP-анализа использовали 24 изолята *P. triticina*. Для осуществления SNP-анализа использовали три стабильно амплифицирующихся локуса: *ctg1-3*, *ctg5-1*, *ctg84-1*. SNP-анализ выявил 14 полиморфных сайтов при использовании маркера *ctg1-3*, 15 сайтов – для *ctg5-1* и 3 сайта – для *ctg84-1*.

Изучение генетической основы устойчивости к бурой ржавчине у возделываемых сортов пшеницы позволяет уточнить причину изменений в структуре популяций патогена.

В **главе 6** приведены результаты анализа генетического разнообразия российских сортов мягкой пшеницы по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины. Проведена работа по изучению сортов, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины. При анализе 119 сортов озимой и 60 – яровой мягкой пшеницы, включенных в Госреестр в 2006-2011 гг., высокой устойчивостью к бурой ржавчине характеризовались 3% озимых сортов и 25% яровых. Для оценки степени разнообразия современных сортов мягкой пшеницы, рекомендуемых для выращивания в РФ, провели идентификацию *Lr*-генов. Анализ показал, что доля яровых сортов с ювенильной устойчивостью, обусловленной высоко- или частично эффективными олигогенами, в Госреестре составляет свыше

20%, причем четверть из них несут Lr-гены, неидентичные известным эффективным. Особо хочется отметить работу, посвященную изучению применимости молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине. За время работы изучено свыше 50 маркеров. Некоторые маркеры показали высокую специфичность и могут быть использованы в маркер-ориентированной селекции.

Результаты изучения изменчивости вирулентности популяций *P. triticina* приведены в главе 7. Изучение частот вирулентности к известным Lr-генам позволяет оценить динамику вирулентности патогена и выявить эффективные гены. Проведена оценка вирулентности популяций *P. triticina* в Европейской части России, Поволжье, Северо-Кавказском, Уральском, Западно-Сибирском регионах, Дагестане. Доля изолятов, устойчивых к разным генам устойчивости пшеницы, в разных регионах различалась. Выявлена высокая эффективность ювенильных Lr-генов Lr29, Lr 41, Lr42, Lr45, Lr47, Lr50, Lr51, Lr53 и Lr57. Существенное варьирование частот вирулентности выявлено на линиях с генами Lr1, Lr2a, Lr2b, Lr2c, Lr9, Lr20 и Lr26. Все проанализированные изоляты, вирулентные к Lr9 или Lr19, характеризовались авирулентностью к Lr26.

В главе 8, фактически являющейся заключением, проведен анализ полученных в процессе выполнения работы результатов, микроэволюционных процессов в российских популяциях *P. triticina*. Дается рекомендация, что данные по представленности Lr-генов в сортах пшеницы следует учитывать в региональных селекционных программах, размещении новых сортов. При создании сортов могут быть использованы доноры известных генов устойчивости к бурой ржавчине и эффективные сочетания генов, выявленные в диссертационной работе. При рассмотрении диссертации возник ряд **вопросов и небольшое замечание к работе.**

1. Может ли возбудитель бурой ржавчины распространяться с семенным материалом? Насколько велика в России роль волонтерных растений пшеницы в сохранении инокулюма?
2. В работе изучаются преимущественно региональные популяции возбудителя бурой ржавчины. Проводились ли эксперименты по изучению внутривидовой вариабельности патогена на поле с одним сортом пшеницы, каково оно по мнению автора в разных регионах?
3. Какие основные факты, полученные в работе, указывают на определяющее действие хозяина в формировании состава популяций *P. triticina* по вирулентности в сравнении с другими. Это, видимо, надо было отразить более четко.

Диссертация Гулятьевой Елены Ивановны является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны методические подходы и теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, вносящее существенный вклад в наши знания о структуре популяций *P. triticina* на мягкой пшенице в РФ и её микроэволюции под влиянием растений-хозяев и выяснение генов устойчивости к возбудителю бурой ржавчины, которые будут эффективны при создании новых сортов яровой и озимой пшеницы. Диссертационная работа обладает внутренним единством, содержит достаточное количество исходных данных, таблиц, написана ясно, выводы обоснованы. Результаты, полученные лично автором, оригинальны, обладают научной новизной и практической значимостью. Основные этапы исследования, выводы и результаты представлены в автореферате и публикациях автора. **Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации,** содержит обоснованные выводы и рекомендации, отвечает требованиям ВАК РФ.

Диссертационная работа Е.И. Гульяевой "Генетическая структура популяций *Puccinia triticina* в России и ее изменчивость под влиянием растения-хозяина" соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Гульяева Елена Ивановна, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.12 "Микология".

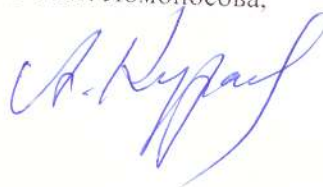
Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры микологии и альгологии «16» января 2019 г., протокол № 8.

Ведущий научный сотрудник
кафедры микологии и альгологии
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук
Специальность: 03.02.12 "Микология"

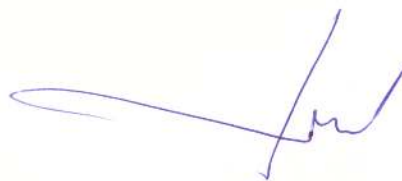


/С.Н.Еланский/

Зав. кафедрой микологии и альгологии
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
доктор биологических наук, проф.



/А.В.Кураков/



Сведения о ведущей организации
по диссертации Гулятьевой Елены Ивановны по теме "Генетическая структура популяций *Russinia tritici* в России и ее изменчивость под влиянием растения-хозяина", представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.12 "Микология".

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, МГУ имени М.В.Ломоносова, или МГУ
Ведомственная принадлежность	Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Место нахождения	г. Москва
Почтовый индекс, адрес организации	119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1
Адрес официального сайта в сети Интернет	www.msu.ru
Телефон	(495) 939-27-29
Адрес электронной почты	info@rector.msu.ru
Список публикаций сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1. Kutuzova I.A., Kokaeva L.Y., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Scolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of <i>Helminthosporium solani</i> strains to the fungicides applied for tuber treatment // Journal of Plant Pathology. 2017. V. 99(3). P.635-642. DOI: 10.4454/jpp.v99i3.3950. 2. Belov G.L., Belosokhov A.F., Kutuzova I.A., Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. <i>Colletotrichum coccodes</i> in potato and tomato leaves in Russia // Journal of Plant Diseases and Protection. 2018. V. 125. P. 311-317. DOI: 10.1007/s41348-017-0138-0. 3. L. Y. Kokaeva, A. F. Belosokhov, E.S. Skolotneva, L.Y. Doeva, S. N. Elansky. Distribution of <i>Alternaria</i> species on blighted potato and tomato leaves in Russia.// Journal of Plant Diseases and Protection. 2018. V.125. P.205-212. DOI: 10.1007/s41348-017-0135-3. 4. Krutyakov Y., Kudrinskiy A., Zherebin P., Yaprntsev A., Pobedinskaya M., Elansky S., Denisov A., Mikhaylov D., Lisichkin G. Tallow amphopolycarboxyglycinate-stabilized silver nanoparticles: new frontiers in development of plant protection products with a broad spectrum of action against phytopathogens// Materials Research Express. 2016. V. 3. P. 1–9. DOI: 10.1088/2053-1591/3/7/075403

5. Elansky S.N., Mita E.D., Skolotneva E.S., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Yu. Effect of difenoconazole on the formation of oospores by *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary Journal of Plant Pathology. 2016. V.98(1). P. 123-127. DOI: 10.4454/JPP.V98I1.049
6. Elansky S.N., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Y., Statsyuk N.V., Dyakov Y.T. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance. // Journal of Plant Pathology. 2015. V.97(3). P.449-456. DOI: 10.4454/JPP.V97I3.020.
7. Skolotneva E. S., Lekomtseva S. N., Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the russian federation // Plant Pathology. 2013. V.62. P. 1003-1010. DOI: 10.1111/ppa.12019.
8. Shamraychuk I.L., Lavrenova V.N., Belozersky M.A., Kurakov A.V., Belyakova G.A., Dunaevsky Y.E. An activity and spectrum of extracellular peptidases in phytopathogenic micromycetes *Fusarium anguioides* and *Fusarium sambucinum* // Mikologiya I Fitopatologiya, Izdatel'stva Nauka (Russian Federation), 2016, V. 50, № 4, P. 250-256.
9. Shamraychuk I.L., Kurakov A.V., Belozerssky M.A., Belyakova G. A., Dunaevsky Y.E. Proteolytic activity and production of melanin by plant pathogenic fungus *Alternaria tomatophila* // Mikologia I Fitopatologiya (Russian Federation), 2018. V.51, № 6. P.390-393.
10. С. Н. Еланский, М. А. Побединская, Кутузова И. А., Ярмеева М.М., Гуркина Т.А., Кокаева Л.Ю. Устойчивость *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes* и *Rhizoctonia solani* к фунгицидам, используемым для обработки клубней картофеля // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32, № 3. С. 50-53.

«Верно»

Проректор –
начальник Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова
А.А.Федянин



«24» января 2019 года.

[Handwritten signature]