

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Новожилова Юрия Капитоновича на диссертационную работу Елены Ивановны Гультяевой «Генетическая структура популяций *Puccinia triticina* в России и её изменчивость под влиянием растения-хозяина», представленную в диссертационный совет Д 006.015.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.12 «Микология»

Диссертационная работа Е.И. Гультяевой посвящена изучению генетической структуры популяций фитопатогенного гриба *Puccinia triticina* Erikss. возбудителя бурой ржавчины пшеницы на территории России, а также влияния растений-хозяев на генетическую структуру его популяций.

Данный базидиомицет из порядка *Pucciniales* относится к роду, в котором известно около 4000 тыс видов. Среди них *P. triticina* один из наиболее значимых фитопатогенов в регионах возделывания пшеницы, как в России, так и за рубежом. Обладая значительным потенциалом возможностей для расселения по воздуху, этот спорообразующий патоген, имеет очень широкий видовой ареал и сложную генетическую структуру популяций. В мире постоянно регистрируются новые патотипы гриба с новым спектром вирулентности. Это обусловлено значительной генетической гетерогенностью популяций паразита, что в свою очередь связано с процессами естественного отбора, направленного на преодоление барьеров защиты различных сортов растения-хозяина в условиях интенсивной селекции. Изучить коэволюционные процессы в системе паразит-хозяин на популяционном уровне, а также разработать ряд рекомендаций и методов для управления генетической защитой от этого опаснейшего вредителя, важно как с теоретической, так и с практической точки зрения, что свидетельствует об актуальности и новизне исследований Е.И. Гультяевой.

Несмотря на то, что анализ расового состава популяций возбудителя бурой ржавчины проводится с 1930 г., многие проблемы генетики популяций остаются нерешенными до настоящего времени. В частности, Е.И. Гультяевой впервые в России исследуется проблема полиморфизма популяций возбудителя бурой ржавчины с использованием как традиционных подходов по признаку вирулентности, так и на основе молекулярных маркеров (RAPD, УП-ПЦР, SSR). Эти исследования были проведены ею впервые не только на очень большом числе сортов мягкой пшеницы, возделываемой в России, но также впервые был охарактеризован молекулярно-генетический полиморфизм дагестанских изолятов *P. triticina* на видах-родичах пшеницы и определена внутривидовая дифференциация патогена на растениях разной ploидности. Е.И. Гультяева впервые провела оценку генетического разнообразия современных российских сортов мягкой пшеницы по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины. В работе убедительно показано, что изменчивость популяции патогена, основанная на действии отбора против определенных аллельных комбинаций, затрагивает не только генетические механизмы вирулентности патогена, но и полиморфизм микросателлитных локусов.

Безусловно, эти новые знания позволят эффективно проводить селекцию сортов пшеницы устойчивых к бурой ржавчине в различных районах России.

Таким образом, теоретическая и практическая значимость, а также новизна проведенных Е.И. Гультяевой исследований не вызывает сомнений.

Диссертационная работа построена по стандартной схеме, состоит из введения, 7

глав с описанием объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения (8-я глава), выводов, списка цитируемой литературы, а также трёх приложений. В них приводятся сведения о происхождении инфекционного материала *Puccinia triticina*, используемого в данных исследованиях, а также характеристики устойчивости к бурой ржавчине изученных сортов мягкой пшеницы, кроме того в приложении представлены документы, подтверждающие участие Е.И. Гуляевой в создании и регистрации сортов пшеницы. Материалы изложены на 312 страницах, работа хорошо иллюстрирована 33 рисунками и графиками, содержит 52 таблицы, наглядно демонстрирующие полученные результаты, имеется список сокращений. Список использованной литературы обширен, включает 452 литературных источников, из них 231 на иностранных языках. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Во введении описывается актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования. Подчеркивается, что к началу данного исследования на территории России было показано существование единой популяции патогена, в которой были выявлены две группы изолятов, распространенных по всей территории РФ. В связи с этим сформулирована основная цель исследования – охарактеризовать генетическую структуру популяций возбудителя бурой ржавчины на территории России и оценить влияние растений - хозяев на ее изменчивость.

Отмечается **личный вклад** автора, принимавшего участие на всех этапах работы в период с 2001 по 2017 гг., начиная от формулирования проблемы, постановки цели и задач до обработки и интерпретации полученных данных.

Результаты работы прошли достаточную апробацию в ходе многочисленных научных конференций, съездов, симпозиумов. Автором опубликовано 111 научных работ, из них 43 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 25 – статьи в других журналах, сборниках и главы в коллективных монографиях, 43 – материалы и тезисы конференций.

Первая глава диссертационной работы «ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)», представляет собой анализ и обобщение данных литературы. В главе представлено подробное описание возбудителя *PUCCINIA TRITICINA* Erikss., его жизненного цикла, морфологии, а также истории изучения структуры популяций этого гриба.

Автор в совершенстве владеет литературой по исследуемой теме, глава написана доступно и понятно, это одна из самых больших глав диссертации. Особенно привлекает то, как автор ясно показывает возможности и ограничения разных методов изучения структуры популяции патогена, начиная с 1920 гг, когда начали использовать наборы сортов-дифференциаторов и признака вирулентности. Впоследствии анализ частот вирулентности к Lg-генам позволил идентифицировать эффективные гены резистентности к болезни и определить степень сходства субпопуляций из различных географических регионов. В главе на основе обширных литературных данных, так и результатов исследований самого диссертанта подробно освещаются вопросы влияния возделываемых сортов пшеницы на изменчивость структуры популяций *Puccinia triticina*, а также данные, касающиеся генетического разнообразия популяций гриба, как на сортах пшеницы, так и на дикорастущих злаках.

На основе анализа литературы делается важный методологический вывод, что мониторинг вирулентности остаётся наиболее доступным и информативным методом, однако он имеет целый ряд ограничений. Это заставляет искать и разрабатывать новые селективно-нейтральные белковые и нуклеиновые маркеры. Именно использование

маркеров ДНК-полиморфизма, во многом предопределило новизну проведённых Е.И. Гульяевой исследований. В разделе главы даётся подробный разбор возможностей использования и ограничений методов использования ДНК-маркеров. Кроме этого в контексте изучения филогении патогена автор приводит литературные данные о последних молекулярных исследованиях с применением SNP-анализа и RAD.

Вторая глава «МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ», включает описание инфекционного материала, также в ней достаточно подробно изложена методика исследований. Использованный объем материала впечатляет. Для оценки влияния выращиваемых сортов пшеницы на изменчивость популяций патогена была изучена устойчивость и генетическое разнообразие к бурой ржавчине у 294 сортов озимой мягкой пшеницы и 213 яровых, включенных в Государственный реестр селекционных достижений (1995-2017 гг.).

Далее автором описаны методы и техника получения монопустульных изолятов и их размножение, анализ ДНК полиморфизма популяций *Puccinia triticina* с использованием таких методов как: RAPD-анализ, ПЦР с универсальными праймерами (т.н. УП-ПЦР), AFLP-анализ (полиморфизм длин амплифицированных ДНК-фрагментов), анализ ДНК-полиморфизма с помощью микросателлитных маркеров (тандемы повторов простых последовательностей), описание подбора ПЦР маркера для идентификации гена LR6AG, а также описание мониторинга эффективности устойчивости TCLR-линий. Даётся подробное изложение методов статистического анализа, включая многомерный статистический анализ с использованием Principal Coordinates (PCoA) в пакете программ GeneAEx.

Третья глава – «СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ В РОССИИ ПО ФЕНОТИПИЧЕСКОМУ СОСТАВУ».

В главе оценивается динамика фенотипического состава *P. triticina* в центрально-европейских регионах России, Поволжье, Северо-Кавказском регионе, западно-азиатских регионах России. На основе анализа 4927 монопустульных изолятов гриба, выделенных из популяций в этих регионах, дается анализ динамики фенотипического состава *P. triticina* в период с 2001 по 2017 г. Диссертантом достоверно показано, что региональные популяции *P. triticina* дифференцировались на группы: дагестанская, азиатская и европейская. Сходство волжской субпопуляции с другими европейскими было незначительно выше, чем с азиатскими. Северокавказские образцы популяций характеризовались более высоким сходством с другими европейскими, чем с дагестанскими.

Четвёртая глава – «СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ НА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЕ ПО ДНК ПОЛИМОРФИЗМУ». В ней дается анализ результатов исследования полиморфизма *P. triticina* по RAPD, УП ПЦР и микросателлитам. Одним из главных выводов этой части диссертации можно считать доказательство наличия общих SSR генотипов в дагестанских, краснодарских и других европейских коллекциях изолятов, что указывает на существенный генный поток между этими популяциями. Этот вывод, основанный на огромном материале, даёт основание для заключения о путях миграции пропагул патогена, а также преобладании клоновой репродукции гриба в изученных регионах. С другой стороны использование SSR маркеров не только подтвердило наличие европейской и азиатской групп популяций по их происхождению, но и позволило выделить отдельную дагестанскую группу, на основании значительного числа уникальных генотипов.

Пятая глава – «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *Puccinia triticina* НА ВИДАХ ПШЕНИЦЫ И ЭГИЛОПСОВ».

Одним из важнейших выводов данной главы является обнаружение высокого генотипического разнообразия дагестанской популяции возбудителя бурой ржавчины на

видах *Triticum* sp. и *Aegilops* sp. по признаку вирулентности и по микросателлитным локусам. Этот результат хорошо согласуется с наблюдаемым высоким видовым разнообразием растений-хозяев из родов *Aegilops*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Thalictrum*, *Anschuga* и *Triticum*, обитают на территории южного Дагестана. Важно подчеркнуть, что Е.И. Гультевой, в результате масштабных исследований, удалось выявить зависимость уровня полиморфизма по вирулентности от плоидности растения хозяина. Ею была обнаружена дифференциация по вирулентности и микросателлитным локусам изолятов на растениях с различной плоидностью. Например, изоляты с гексаплоидных и диплоидных видов *Triticum* и *Aegilops* характеризовались более высоким полиморфизмом по вирулентности, чем изоляты с тетраплоидных видов. Однако, несмотря на дифференциацию между дагестанскими изолятами по вирулентности и микросателлитным локусам автором было определено высокое филогенетическое родство между ними, а также с изолятами из других стран по SNP полиморфизму, что свидетельствует о низком уровне дивергенции в границах данного вида гриба.

Шестая глава «ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РОССИЙСКИХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ». В главе приводятся сведения о сортах, включенных в государственный реестр селекционных достижений, по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины, а также результаты исследования генетического разнообразия сортов пшеницы, рекомендуемых для выращивания в РФ. Данные исследования были проведены прежде всего в отношении так называемых высоко- и частично эффективных Lr-генов, ответственных за устойчивость пшеницы к бурой ржавчине. Е.И. Гультева одной из первых в России удалось провести тестирование (валидацию) способности ДНК-маркеров предсказывать фенотип на широком наборе сортов, изогенных линий, популяций, в различном генетическом окружении и в различных условиях окружающей среды. Это, безусловно, является важнейшим практическим результатом всей выполненной диссертантом работы. Не удивительно, что эти результаты исследования отмечены рядом дипломов за лучшую завершённую научную разработку.

Седьмая глава «ВЛИЯНИЕ ВЫРАЩИВАЕМЫХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ *PUCCINIA TRITICINA* ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ»

В данной главе проанализирована многолетняя динамика (2001-2017 гг.) вирулентности возбудителя бурой ржавчины пшеницы в районах исследования. Для каждого из районов исследования данные представлены в виде таблиц с частотами вирулентности *P. triticina* в 2001-2009 гг. (%), а динамика изменений частот вирулентности показана в виде графиков. Учитывая огромный фактический материал полученный автором, крайне сложно уловить дифференциацию популяций по частотам вирулентности, представленных в виде таблиц. Чтобы решить эту методическую задачу, автором успешно проведена визуализация данных с помощью метода многомерной статистики (метод главных координат). В результате наглядно показано, что дагестанские и азиатские образцы популяций существенно дифференцировались между собой и от других изученных. Северокавказские образцы популяций были ближе по сходству с европейскими, чем с дагестанскими. Волжские образцы *P. triticina* имели близкую степень различий с западноазиатскими и европейскими.

Восьмая глава «ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В

РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ *Puccinia triticina*» является заключением, в котором подводятся итоги проделанной работы, и даётся оценка представленных результатов многолетних непрерывных исследований. Автор обоснованно на основании собственных результатов и критического анализа литературных источников характеризует происходящие в популяции патогена микроэволюционные процессы, а также дает объяснение наблюдаемому спектру частот вирулентности к гену Lr9. Автор объясняет выявленные основные тренды распространения тех или иных генотипов патогена на территории РФ, в том числе привлекая данные климатологии и биогеографии. В главе 8 диссертант обсуждает сложные вопросы биогеографии и филогеографии бурой ржавчины. Как известно генный поток - обмен генами между популяциями одного вида в результате свободного скрещивания их особей. Часть особей-мигрантов одной популяции проникает в другую, и их гены включаются в генофонд этой популяции. Возникают вопросы. Какой механизм проникновения этих особей в случае ржавчины? Это антропогенные факторы, или биогенные (миграции птиц, наличие популяций растений-хозяев, служащих мостами между разделенными районами), или преимущественно абиогенные (роза ветров)? В чем причина неравномерного обмена генами? Некоторые вопросы находят свой ответ в результатах данного исследования. Так, на основе анализа распространения SSR генотипов в европейских и азиатских популяциях подтверждена, высказанная ранее другими авторами, гипотеза о возможности воздушного заноса спор гриба в Западную Сибирь из южных или юго-западных районов европейской части России, а также западных районов Казахстана.

Известно, что перемещение воздушных масс из Кавказа за Урал ограничивает антициклон с севера и циклон между Каспием и Аралом. Одно из возможных объяснений наблюдаемого спектра частот вирулентности к гену Lr9 связано со значительным снижением потока генов патогена из Северного Кавказа в Казахстан и Западную Сибирь из-за особенностей конфигурации розы ветров.

Из заключения хорошо видно как диссертант взвешенно оценивает полученные результаты и хорошо понимает, что возможные ошибки в выводах обратно пропорциональны масштабам выводов. В частности расхождение результатов SSR-анализа с результатами аналогичных исследований в лаборатории Cereal Diseases Laboratory, диссертант справедливо объясняет различием изученных коллекций изолятов по происхождению и времени сбора. Важно, что в диссертации чётко разграничивается области применения маркеров вирулентности и микросателлитных маркеров, первые лучше подходят для практической селекции и мониторинга, вторые — для изучения микроэволюционных процессов.

Выводы по результатам работы обоснованы и корректны, они полностью соответствуют поставленным задачам исследования.

Автореферат соответствует содержанию диссертации.

При чтении диссертации возникли вопросы и ряд небольших замечаний:

В главе 1, на мой взгляд, следовало уделить больше внимания систематике самого объекта исследования - *Puccinia triticina* Erikss. Следует подчеркнуть, что из-за относительно бедной морфологии и появления молекулярно-генетических данных систематика и номенклатура ржавчинных грибов рода *Puccinia* в настоящее время

крайне неустойчива и требует уточнения. Явно наблюдается конфликт между морфологической и филогенетической концепциями вида в отношении этого таксона. Доказательством является то, что объект диссертации, указанный как *Puccinia triticina*, если следовать последним данным из Index Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org/GSD/GSDspecies.asp?RecordID=145187>), является синонимом *Puccinia recondita* Roberge ex Desm. 1857, к которому относится еще наряду с “triticina” еще 71 синоним! Работа Liu et al., 2013 (Molecular phylogenetic relationships of the brown leaf rust fungi on wheat, rye, and other grasses. Plant Dis. 97:1408-1417) ясно показывает, что на филогенетическом дереве, построенном с использованием маркерных последовательностей 5.8S, ITS2, и фактора элонгации EF1, гриб *P. triticina* формирует единую кладу с близкими видами *P. persistens* на *Elymus repens* и *E. intermedia*.

На странице 11 формулировка «В связи с интенсивным генным потоком между европейской и кавказской популяциями нецелесообразно использование одних и тех же генов в этих регионах» не совсем понятна. Наверно автор хотел сказать, что «Видимо нецелесообразно использовать селекцию одних и тех же генов в этих регионах».

На стр. 16 название растения-хозяина *Clematis manjichurica* дано с опечаткой, правильное название - *Clematis mandshurica* Rupr.

Глава 2, стр. 69. Фразу «Инокуляцию сортов в фазе проростков проводили популяциями бурой ржавчины широкого географического происхождения и клонами, маркированными вирулентностью к генам Lr9, Lr19 и Lr26.» нужно было бы изменить, так как инокуляцию нельзя проводить популяциями и клонами.

Глава 3

Фраза на стр. 77 «Определение степени сходства по фенотипическому составу между спорowymi образцами популяций, собранными в различных географических точках, позволяет судить о том, принадлежат ли они к одной или разным генеральным популяциям» вызывает у меня вопрос, что такое «генеральная популяция»?

Стр. 78. Термин «урединиообразцы», наверно, лучше заменить на «образцы урединиоспор».

Сокращение ГСУ – это государственный селекционный участок? Нужно дать один раз полное название для этой аббревиатуры.

Стр. 79. Автор пишет «С западными ветрами, которые часто отмечаются на данной территории, через территорию стран Балтии споры могут заноситься на территорию других областей Северо-Запада и Центрально-Европейскую часть РФ». В связи с этим представляет интерес информация о фенотипическом разнообразии популяций *P. triticina* из стран Восточной Европы и Балтии. Имеется ли эта информация? Если таковая имеется, ее следовало бы включить в литературный обзор.

Стр. 107. Автор отмечает, что «Согласно всем статистическим индексам, минимальным разнообразием по фенотипическому составу и вирулентности характеризовалась новгородская субпопуляция, максимальным – псковская (рис. 11а)». Имеется ли объяснение этому факту, учитывая географическую близость данных субпопуляций?

В подписи к рисунку 33 (стр. 207) есть опечатка «Puccinian» нужно исправить «Puccinia».

Стр. 207. Номер раздела главы 5.7 следует заменить на 7.7.

Стр. 213. Формулировка предложения «Только перманентные многолетние исследования популяций патогена позволяют охарактеризовать происходящие в них микроэволюционные процессы, поскольку существенные различия в структуре популяций могут наблюдаться в отдельные годы из-за высокой зависимости анализа вирулентности от влияния растения-хозяина» представляется неудачной.

Видимо имеется ввиду «... "из-за значительного влияния растения-хозяина на уровень вирулентности ржавчины".

Стр. 277. В списке сокращений перевод аббревиатуры SSR (simple sequence repeats) как «микросателиты» не верен, эту аббревиатуру следует переводить как «тандемы повторов простых последовательностей» или «повторы простых последовательностей»
SSR – simple sequence repeats, микросателиты

Имеются очень немного не выправленных опечатков в списке литературы.

Высказанные замечания носят дискуссионный или рекомендательный характер и не умаляют достоинств этой работы и не ставят под сомнение полученные результаты.

В целом можно отметить, что диссертационная работа Е.И. Гульяевой представляет собой полноценное законченное научное исследование, выполненное на высоком научном уровне с использованием огромного фактического материала. Работа включает в себя ряд теоретических положений, и имеет очень важное значение для популяционной генетики, биогеографии, микологии, фитопатологии и селекции растений.

Материалы диссертационной работы Е.И. Гульяевой могут быть использованы в вузах, в курсах общей экологии, микологии, генетики, фитопатологии, а также в практике селекционной работы и защиты растений, что, безусловно, имеет существенное значение для экономики и развития РФ.

На основании вышеизложенного можно резюмировать, что диссертация Е.И. Гульяевой «Генетическая структура популяций *Puccinia triticina* в России и её изменчивость под влиянием растения-хозяина» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации (№842 от 24.09.2013 г.), и требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор, Гульяева Елена Ивановна, несомненно, достойна присуждения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.12 «Микология».

Доктор биологических наук по специальности 03.00.24 – «Микология», профессор, главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории систематики и географии грибов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук»
e-mail: YNovozhilov@binran.ru
197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2;
тел. +7 (812) 372-54-43;
E-mail: binadmin@binran.ru
Web-сайт: <https://www.binran.ru/contacts/>

Новожилов

Юрий Капитонович

31 января 2019 г.

Подпись руки *Новожилова Ю.И.*
ЗАВЕРЯЮ *М.П. Капитонов*
ОТДЕЛ КАДРОВ
Ботанического института
им. В.Л. Комарова
Российской академии наук