

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Лагуновской Елены Владимировны «Молекулярно-генетические подходы для повышения эффективности андрогенеза *in vitro* и отбора селекционно ценных линий удвоенных гаплоидов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и тритикале (*× Triticosecale* Wittm.)», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки. Диссертационная работа Лагуновской Е.В. представляет собой законченное исследование, посвященное изучению молекулярно-генетических факторов, определяющих эффективность андрогенеза *in vitro*, и научному обоснованию современных методов отбора селекционно ценных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале на основе высокоэффективных молекулярных маркеров. По предмету исследования, кругу решаемых научных задач, применяемым методическим подходам диссертация Лагуновской Е.В. соответствует отрасли – биологические науки, специальности 03.02.07 – «генетика» согласно паспорту специальности, утвержденному приказом ВАК Республики Беларусь № 300 от 23.11.2016 (п.2. Функциональная организация генома. Кодированные и некодирующие области генома. Генетическая изменчивость и характер наследования метаболических систем. ДНК-маркеры; п.12. Генетика растений. Генетические основы селекции растений, клеточная и хромосомная инженерия. Биотехнология в селекции растений. Повышение адаптивного потенциала культурных растений. Генетические основы ускорения и повышения эффективности селекционного процесса. ДНК-паспортизация растений. Сохранение и изучение генетических ресурсов. Создание нового генофонда, генетических коллекций, источников и доноров хозяйственно-полезных признаков; п.13. Генетика биологических систем *in vitro*. Экспрессия генов в культуре *in vitro*. Процессы андрогенеза и гиногенеза. Закономерности и механизмы изменчивости, индуцированной условиями *in vitro*. Создание нового генетического материала биотехнологическими методами. Процессы каллусо- и органогенеза растений) и профиллю совета по защите диссертаций Д 01.31.01 при ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

Актуальность темы диссертации. Диссертационная работа Лагуновской Е.В. посвящена актуальной проблеме современной генетики – научному обоснованию молекулярно-генетических подходов, сочетающих биотехнологические и молекулярно-генетические методы, для получения нового селекционного материала с целью выведения высокоурожайных сортов пшеницы и тритикале с улучшенным качеством зерна. Известно, что использование метода культуры пыльников позволяет значительно сократить сроки создания новых сортов, однако широкому внедрению методики препятствует низкий выход новообразований и растений-регенерантов, а также высокий процент хлорофилл-дефектных растений. В этой связи актуальность диссертационной работы Лагуновской Е.В., в которой определены молекулярно-генетические маркеры у пшеницы и тритикале, обеспечивающие выявление генотипов с высокой способностью к индуцированному андрогенезу в культуре пыльников *in vitro*; выявлены гомозиготные гаплоидные линии у двух зерновых культур и разработана методика KASP-генотипирования, примененная для скрининга гомозиготных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, не вызывает сомнений.

Диссертационная работа выполнена в рамках 2 заданий ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий», подпрограмма «Геномика» и 2 мероприятий ГП «Научное обеспечение технологий и техника», подпрограмма «Инновационные биотехнологии», соответствует пункту 3.6

«Идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных» Пост. СМ РБ № 585 от 19 апреля 2010 г.; приоритетным направлениям научных исследований РБ на 2016-2020 гг. (п. 3 «Биологические системы и технологии» Пост. СМ РБ № 190 от 12 марта 2015 г.; приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности РБ на 2021-2025 гг. (п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства», утвержденных Указом Президента РБ № 156 от 7 мая 2020 г.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту. Результаты, полученные в диссертации и положения, выносимые на защиту, являются новыми.

Автором установлено, что для культивирования пыльников пшеницы и тритикале оптимальным является использование индукционной питательной среды С17, дополненной 2,4-Д (2,0 мг/л) и кинетином (0,5 мг/л), и выращивание растений-доноров пыльников в полевых условиях. Выделены генотипы пшеницы (линии DH48-02-06, DH52-02-06, сорт Ростань) и тритикале (линии DH3-1-09, DH11-2-09, DH12-1-09, DH27-1-08-1), контрастные по параметрам андрогенеза *in vitro*.

Следует отметить пионерские данные автора, позволившие осуществить поиск молекулярных маркеров генов, детерминирующих высокую эффективность андрогенеза *in vitro*. Установлены 3 полиморфных SSR-локуса у контрастных по параметрам андрогенеза родительских генотипов пшеницы, предположительно связанные со способностью к андрогенезу *in vitro*: *Xgwm291*, *Xgwm595* (хромосома 5A), *Xgwm371* (хромосома 5B) и 5 SSR локусов у родительских генотипов тритикале: *Xgwm312* (хромосома 2A), *Xbarc318* (хромосома 2B), *Xgwm156*, *Xgwm291* (хромосома 5A), *Xgwm540* (хромосома 5B).

Проведена оценка гомозиготности 71 линии пшеницы и тритикале, полученных в культуре пыльников *in vitro* с использованием 13 ISSR-маркеров. Для генотипов пшеницы наибольший внутрилинейный полиморфизм обнаружен при использовании праймеров к локусам *ISSR 17*, *UBC 807* и *UBC 856*, а для тритикале – при использовании праймера к локусу *ISSR 17*. При помощи анализа внутрилинейного полиморфизма исследуемых ISSR-локусов у индивидуальных растений полученных линий пшеницы и тритикале выявлено 14 гомозиготных DH-линий пшеницы и 24 DH-линии тритикале.

Разработана методика KASP-генотипирования по генам, ассоциированным с массой 1000 зерен и качеством зерна пшеницы и тритикале, с помощью которой впервые в Беларуси выполнено генотипирование 38 гомозиготных линий пшеницы и тритикале по 10 генам, ассоциированным с массой 1000 зерен (*TaTGW6-A1*, *TaGASR7-A1*, *TaGs3-D1*, *TaCKX-D1*) и качественными характеристиками зерна (*Gpc-B1*, *Ppo-A1*, *Lox-B1*, *Psy-A1*, *TaPod-A1*, *Zds-A1*). Выделено 6 линий пшеницы (DH8-5/10, DH65-5-12, DH66-3-(O)-12, DH67-9-12, DH67-1-12, DH69-2-12) и 3 линии тритикале (DH80-1-13, DH80-3-13, DH80-4-13), несущих комплекс из 5 благоприятных аллелей исследованных генов и обладающих целевыми признаками на уровне контрольных сортов.

В целом, результаты диссертационной работы Лагуновской Е.В. расширяют научные представления о генетической детерминации способности к индуцированному андрогенезу и регенерации пшеницы и тритикале в культуре пыльников *in vitro* и создают научную основу для использования молекулярно-генетических подходов в селекционном процессе для полу-

чения высокоурожайных сортов пшеницы и тритикале с высоким потребительским качеством зерна.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Автором представлен значительный объем экспериментальных данных, полученных с использованием современных молекулярно-генетических методов исследования. Полученные в результате диссертационного исследования результаты статистически оценены с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, GenAIEx v.6.5 и SPSS v.20.0. Сделанные выводы вытекают из основного содержания диссертации, соответствуют цели и задачам работы.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию. Результаты рецензируемой работы имеют высокую научную и практическую значимость.

Научная значимость полученных в работе результатов состоит в развитии научных представлений о генетической детерминации способности к андрогенезу *in vitro* и хозяйственно-ценных признаков (масса 1000 зерен, активность липоксигеназы и полифенолоксидазы, содержание каротиноидов в зерне) у пшеницы и тритикале.

Несомненную научную ценность представляют результаты работы, свидетельствующие о значимой ассоциативной связи между эффективностью андрогенеза *in vitro* и аллельным составом микросателлитных локусов пшеницы *Xgwm371*, *Xgwm595* и тритикале *Xgwm312*, *Xbarc318*, *Xgwm291*, *Xgwm156*, *Xgwm540*, что определяет возможность их использования в качестве эффективных маркеров для выявления генотипов с высокой способностью к андрогенезу *in vitro*.

Важно также отметить научную значимость полученных результатов, которые подтверждают необходимость использования ISSR-маркеров для генетического контроля линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале, созданных методом индуцированного андрогенеза *in vitro*, позволивших выявить 14 гомозиготных ДН-линий пшеницы (77,8%) и 24 ДН-линии тритикале (45,3%), что позволяет выявлять перспективные линии для ускорения селекционного процесса.

Автором впервые научно обоснована эффективность использования разработанной методики KASP-генотипирования для скрининга гомозиготных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале по 10 генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, позволило выделить шесть ДН-линий пшеницы (ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(O)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12) и три ДН-линии тритикале (ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13) с максимальным количеством (пять) благоприятных аллелей генов, контролирующих массу 1000 зерен и качество зерна. Эти генотипы являются новым селекционным материалом для целенаправленного получения высокопродуктивных сортов пшеницы и тритикале с улучшенным качеством зерна.

В результате выполненной диссертационной работы получены экспериментальные данные, имеющие несомненное практическое значение для ускорения и оптимизации отбора ценных генотипов пшеницы и тритикале на основе гомозиготных ДН-линий. Сведения об аллелях SSR-локусов, ассоциированных с эмбрионным потенциалом в культуре пыльников *in vitro*, рекомендуется использовать при скрининге генотипов для целенаправленного получения линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале.

Полученные в результате выполнения работы образцы ДНК линий удвоенных гаплоидов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ярового гексаплоидного тритикале (\times *Triticosecale* Wittm.) переданы автором в «Республиканский банк ДНК человека, животных, рас-

тений и микроорганизмов» для использования в научных целях (акты передачи от 16.12.2022, 23.12.2022, 14.12.2023).

Информационный ресурс «База данных сортов и линий мягкой пшеницы с хозяйственно ценными генами», разработанный с непосредственным участием Лагуновской Е.В., зарегистрирован в Государственном регистре информационных ресурсов (Свидетельство о госрегистрации № 1342336786 от 11.12.2023).

Автором получены новые линии удвоенных гаплоидов, несущие комплекс благоприятных аллелей генов хозяйственно ценных признаков, которые переданы в РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» (акты передачи от 11.12.2017; от 11.03.2024) и рекомендованы для использования в селекции при создании новых сортов мягкой пшеницы и гексаплоидного тритикале, обладающих высокой урожайностью и улучшенным качеством зерна.

Важную экономическую и социальную значимость имеет разработанная методика KASP-генотипирования, которая была успешно использована при создании сорта мягкой яровой пшеницы Инновация. Эта методика рекомендуется к применению в селекционных научно-исследовательских учреждениях для отбора генотипов, несущих благоприятные аллели генов, ассоциированных с продуктивностью и качеством зерна, а также в качестве учебного пособия для преподавателей, аспирантов, магистрантов и студентов ВУЗов биологического и аграрного профиля в Беларуси и за рубежом.

Важно отметить, что Лагуновская Е.В. принимала активное участие в создании продовольственного сорта мягкой яровой пшеницы Инновация, выведенного совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» и переданного в Государственное сортоиспытание Республики Беларусь (акт передачи от 12.12.2023). Сорт характеризуется высокой урожайностью зерна (58,0 ц/га), превышающей на 12,3 ц/га стандарт.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати. Основные результаты диссертационной работы Лагуновской Е.В. достаточно полно опубликованы в 14 работах, включая 5 статей в научных изданиях из перечня ВАК Беларуси, (4,0 а. л.), 5 статей в сборниках научных трудов и материалов научных конференций, 3 тезиса докладов и 1 методические рекомендации (2,6 а. л.).

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК. Диссертационная работа оформлена в соответствии с требованиями ВАК Беларуси. Диссертационная работа содержит введение, общую характеристику работы, 5 глав, заключение, список использованных источников и 2 приложения (приложение А и Приложение Б). Общий объем диссертации составляет 161 страницу, содержит 16 рисунков, 30 таблиц. Библиографический список включает 281 источник, в том числе 229 на иностранном языке.

Представленный в диссертации обзор литературы дает достаточно четкое представление об особенностях морфогенеза злаков в культуре пыльников *in vitro*. Автором проведен анализ современных литературных сведений, касающихся применения молекулярных маркеров в генетических исследованиях растений, включая SSR-метод в исследованиях растительных геномов, метод ISSR-маркеров в молекулярно-генетических исследованиях растений и применение технологии KASP-генотипирования в маркер сопутствующей селекции растений. Детальный анализ современных литературных сведений, касающихся темы диссертационной работы, позволил автору корректно и четко сформулировать цель и задачи исследования.

Во второй главе подробно описаны объекты и методы исследования. Диссертационная работа Лагуновской Е.В. выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных биотехнологических и молекулярно-генетических методов, включая

культивирование изолированных пыльников пшеницы и тритикале *in vitro*; получение гибридных популяций F₁ и F₂; ПЦР-анализ полиморфизма SSR-локусов и гомозиготности линий с помощью ISSR-маркеров; методику KASP-генотипирования. Используемые современные методы исследования, а также оригинальные схемы экспериментов позволили автору сделать однозначные выводы на основе полученных экспериментальных данных.

Экспериментальная глава 3 посвящена подбору контрастных по эффективности андрогенеза *in vitro* генотипов тритикале и пшеницы. В результате проведенных исследований автором отобраны контрастные по параметрам андрогенеза генотипы пшеницы (DH48-02-06, DH52-02-06, сорт Ростань) и тритикале (DH3-1-09, DH11-2-09, DH12-1-09, DH27-1-08-1). На основе контрастных по параметрам андрогенеза форм пшеницы и тритикале в реципрокных скрещиваниях получены расщепляющиеся популяции F₂ для двух исследованных культур.

В главе 4 представлены результаты идентификации микросателлитных локусов, ассоциированных с высоким эмбрионным потенциалом в культуре пыльников пшеницы и тритикале. Автором выявлено три полиморфных локуса у родительских генотипов пшеницы (*Xgwm291*, *Xgwm595* (хромосома 5A); *Xgwm371* (хромосома 5B)) и пять полиморфных локусов у родительских генотипов тритикале (*Xgwm312* (хромосома 2A); *Xbarc318* (хромосома 2B); *Xgwm156*, *Xgwm291* (хромосома 5A); *Xgwm540* (хромосома 5B)), контрастных по значениям параметров андрогенеза *in vitro*. С использованием расщепляющихся гибридных популяций F₂ установлено наличие статистически значимой связи между аллельным составом исследованных микросателлитных локусов и значениями параметров андрогенеза *in vitro* у изученных зерновых культур.

В заключительной главе 5 представлены результаты молекулярно-генетического анализа линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале, полученных в культуре пыльников *in vitro*. Экспериментально доказано, что использование ISSR-маркеров позволяет эффективно идентифицировать гомозиготные и гетерозиготные ДН-линии. На основе выполненных исследований разработана методика KASP-генотипирования по генам, ассоциированным с массой 1000 зерен и качеством зерна, которая успешно использована совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» при создании сорта мягкой яровой пшеницы Инновация.

Диссертационная работа хорошо оформлена, написана четким и ясным литературным языком. Изложение экспериментальных результатов выстроено в логической последовательности, все обсуждаемые положения и выводы хорошо проиллюстрированы в 16 рисунках и 30 таблицах и в двух Приложениях (А и Б).

Автореферат диссертации отражает суть работы, ее результаты и основные положения, которые автор выносит на защиту.

В диссертации соискатель ученой степени приводит ссылки с указанием авторов и источников, материалы которых он использует, а также на собственные публикации, в которых содержатся материалы, излагаемые в диссертации. При использовании в диссертации результатов, принадлежащих лицам, совместно с которыми были написаны научные работы, автор ссылается на них и отмечает это в диссертации и автореферате ссылкой на источник. На основании вышеизложенного следует заключить, что в диссертации Лагуновской Е.В. выполнены требования пункта 26 Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь.

В результате анализа диссертационной работы Лагуновской Е.В. возник ряд замечаний и пожеланий:

1. Не совсем понятно, почему автор в выводах к Главе 2 (стр.64) дает ссылки только на свои работы, хотя приводит описание стандартных биотехнологических и молекулярно-генетических методов анализа.

2. Хотелось бы уточнить, как получены данные, представленные в таблице 3.2 (стр. 66) по оценке эффективности андрогенеза в культуре *in vitro* у тритикале на разных питательных средах, в которой по описанию автора представлены «суммарные показатели для всех изученных генотипов тритикале». Поскольку таких генотипов было изучено всего 17 (от 5 до 12 на каждой из 3 питательных сред) и они могут иметь разный андрогенный потенциал, правомерно ли представлять показатели, характеризующие способность к андрогенезу, как сумму значений без учета количества генотипов?

3. При описании полученных линий удвоенных гаплоидов пшеницы в главе 5 (стр. 105) автор отмечает, что эти линии несут по пять благоприятных аллелей генов, контролирующей массу 1000 зерен и качественные характеристики зерна. Хотелось бы уточнить, как эти новые линии по количеству и соотношению благоприятных аллелей соотносятся со стандартным сортом мягкой яровой пшеницы Любава.

4. Полученные автором результаты опубликованы только в русскоязычных научных журналах и других научных изданиях и представлены на 3 международных конференциях, 2 из которых проходили в г. Минске. Хотелось бы пожелать автору работы представить свои результаты не только в русскоязычных статьях, но и в зарубежных изданиях, чтобы расширить их доступность для научной общественности.

5. В работе имеются также некоторые стилистические погрешности и немногочисленные опечатки. На стр.8 диссертаций в последнем абзаце выражение «однонуклеотидный полиморфизм» дважды повторяется в одном предложении; на стр.27 во втором абзаце некорректно построено предложение «позволяет получать растения с необходимыми селекционеру набором признаков...»; на стр. 80 в первом абзаце при описании рисунка 4.5 ошибочно указана «мягкая яровая пшеница», хотя на рисунке представлен межлинейный полиморфизм у гаплоидных линий тритикале; на стр.90 в первом абзаце ошибочно указан номер таблицы 4.8, хотя должен быть номер 4.7, и далее в конце второго абзаца стоит ссылка на таблицу 4.9, хотя описываются данные, представленные в таблице 4.8.

Высказанные замечания, однако, не влияют на сделанные автором выводы и положения, выносимые на защиту, а некоторые из них могут быть уточнены в дискуссии.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует. Считаю, что диссертация Лагуновской Елены Владимировны «Молекулярно-генетические подходы для повышения эффективности андрогенеза *in vitro* и отбора селекционно ценных линий удвоенных гаплоидов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и тритикале (*×Triticosecale* Wittm.), представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, является законченным научным трудом и по актуальности темы, объему и значимости полученных результатов соответствует требованиям, установленным главой 3 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий ВАК Беларуси, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор работы Лагуновская Е.В. является высококвалифицированным специалистом в области генетики и заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика за новые научно обоснованные результаты, определяющие молекулярно-генетические критерии повышения эффективности андрогенеза *in vitro* и отбора перспективных генотипов пшеницы и тритикале и включающие:

– обнаружение ассоциативной связи между эффективностью андрогенеза *in vitro* и аллельным составом микросателлитных локусов пшеницы (Xgwm371, Xgwm595) и тритикале (Xgwm312, Xbarc318, Xgwm291, Xgwm156, Xgwm540) и возможности их использования в качестве эффективных маркеров для выявления генотипов с высокой способностью к андрогенезу;

– доказательство эффективности использования ISSR-маркеров для генетического контроля гомозиготности линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале и выявление 14 гомозиготных ДН-линий пшеницы (77,8%) и 24 ДН-линии тритикале (45,3%), перспективных для ускорения селекционного процесса;

– разработку методики KASP-генотипирования для скрининга гомозиготных линий удвоенных гаплоидов пшеницы и тритикале по генам, ассоциированным с хозяйственно ценными признаками, и выделение шести ДН-линий пшеницы (ДН8-5/10, ДН65-5-12, ДН66-3-(O)-12, ДН67-9-12, ДН67-1-12, ДН69-2-12) и трех ДН-линий тритикале (ДН80-1-13, ДН80-3-13, ДН80-4-13) с максимальным количеством (пять) благоприятных аллелей генов, контролирующих массу 1000 зерен и качество зерна;

– участие в создании высокоурожайного продовольственного сорта мягкой яровой пшеницы Инновация, выведенного совместно с РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» и переданного в Государственное сортоиспытание Республики Беларусь,

что в совокупности расширяет научные представления о генетической детерминации способности к индуцированному андрогенезу и регенерации у пшеницы и тритикале в культуре пыльников *in vitro* и создает научную основу для использования молекулярно-генетических подходов в селекционном процессе.

Выражаю свое согласие на размещение отзыва о диссертации на официальном сайте Государственного научного учреждения «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси» в глобальной компьютерной сети Интернет.

Официальный оппонент,
заведующий лабораторией прикладной
биофизики и биохимии ГНУ «Институт
биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси», член-корр., д.б.н.,
доцент



Л.Ф. Кабашникова



кабашникова Л.Ф.
Подпись удостоверяю
Заместитель директора
по научной работе
Л.М. Лукьяненко

06.02.2025