

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии»,

доктор биологических наук, профессор РАН,

Г.И. Карлов

« 21 » нояб 2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального бюджетного государственного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ)» на диссертационную работу Алжарамани Насим на тему: «Поиск источников мужской стерильности и разработка методов генетического усовершенствования моркови (*D. carota* L.)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологических науки) в диссертационный совет 35.2.030.08 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Актуальность темы. Морковь (*Daucus carota* L.) с диплоидным набором хромосом $2n=2x=18$ является одним из ключевых корнеплодных видов, широко культивируемых в мировом сельском хозяйстве, обладая значительным экономическим потенциалом. Этот вид часто используется в биотехнологических исследованиях в качестве модельного организма, при этом методы культивирования *in vitro* обеспечивают расширение возможностей для оптимизации агротехнологий.

Современные сорта моркови преимущественно формируются посредством перекрестного опыления. На рынке представлены гибридные семена, направленные на улучшение урожайности и качества продукции, однако количественные исследования эффекта гетерозиса в моркови остаются недостаточно разработанными. В селекции моркови широко применяется создание гибридов первого поколения (F1), основанных на механизме цитоплазматической мужской стерильности ЦМС.

Индукция аллоплазматической мужской стерильности у *Daucus carota* посредством слияния протопластов представляет собой значительный научный интерес. Данный подход может потенциально индуцировать мужскую стерильность моркови независимо от линий закрепителей стерильности, тем самым преодолевая ограничения традиционных систем ЯЦМС, связанных с восстановлением фертильности и сегрегацией признака, что снижает эффективность селекции.

Соматическая гибридизация обеспечивает непосредственное объединение цитоплазматических и ядерных геномов, что гарантирует стабильное наследование митохондриальной ДНК, ответственной за мужскую стерильность в последующих поколениях. Это обеспечивает генетическую стабильность признака ЦМС вне зависимости от генетического фона линий, с которыми осуществляются скрещивания, что значительно упрощает селекционные программы и снижает затраты на производство гибридов моркови.

Научная новизна работы. Впервые были выявлены морфологические признаки мужской стерильности у цветков сельдерея и фенхеля: у сельдерея стерильность проявляется редукцией тычинок и отсутствием фертильной пыльцы, тогда как у фенхеля — отсутствием фертильной пыльцы при сохранении нормальной, нередуцированной морфологии пыльников.

На основании молекулярно-генетического анализа впервые подтверждены различия в генетических факторах, определяющих мужскую стерильность у фенхеля (*F. vulgare*) и сельдерея (*A. graveolens*), по сравнению с генетическими факторами S-(стерильного)-типа цитоплазмы моркови (*D. carota*), с использованием праймеров смт-1 и смт-2.

Установлена половая несовместимость в комбинациях скрещивания мужски стерильных образцов фенхеля и сельдерея с фертильными образцами моркови - *F. vulgare* × *D. carota*, *A. graveolens* × *D. carota*.

Выявлено существенное влияние фактора «концентрация осмотического агента» и фактора «экспозиция» на выход жизнеспособных протопластов. Показано, что сочетание условий - 0,5 М сорбит, 6 часа экспозиция позволяют достичь максимального выхода жизнеспособных протопластов из 5-недельных листьев моркови (*D. carota*).

Представлена зависимость, согласно которой увеличение времени ферментативной обработки листьев 5-недельных проростков моркови с использованием 1% (W/V) целлюлазы и 0,1% (W/V) пектиназы обуславливает повышение выхода протопластов при одновременном снижении их жизнеспособности.

Продемонстрирована возможность проведения хемослияния протопластов моркови (*D. carota*), выделенных из мезофилла листа, с протопластами фенхеля (*F. vulgare*), полученными из каллуса, при этом частота образования бинуклеарных гетерокарионов составила $4,6 \times 10^4$ на исходное количество протопластов в суспензии 2×10^5 .

Теоретическая и практическая значимость. Впервые выявлены и комплексно охарактеризованы как фенотипически, так и молекулярно-генетически образцы фенхеля (*F. vulgare*) F1 «Драгон» и сельдерея (*A. graveolens*) F1 «Мамбо», F1 «Сейнния» и F1 «Балина», проявляющие

мужскую стерильность, контролируемую генетическим фактором, отличным от S-типа мужской стерильности моркови.

Обнаруженные мужские стерильные линии фенхеля и сельдерея рассматриваются как перспективные генетические ресурсы для формирования аллоплазматической цитоплазматической мужской стерильности моркови (*D. carota*).

Показано отсутствие формирования полового потомства при опылении фертильной пылью моркови (*D. carota*) более 2000 цветков мужски стерильных образцов сельдерея (*A. graveolens*) и 300 фенхеля (*F. vulgare*), в том числе с использованием технологии спасения зародышей 269 семязачатков в комбинации межродового скрещивания (*A. graveolens* × *D. carota*) и 285 семязачатков в комбинации (*F. vulgare* × *D. carota*), что свидетельствует о неэффективности половой гибридизации и необходимости применения соматической гибридизации для интрогрессии признака мужской стерильности в морковь (*D. carota*).

Выявленная зависимость между выходом и жизнеспособностью протопластов моркови позволила усовершенствовать метод экстракции, что обеспечило получение $1,51 \times 10^5$ жизнеспособных протопластов с уровнем жизнеспособности 95%, что превышает показатели стандартного метода в 13 раз.

Впервые разработан и представлен метод выделения протопластов из клеточной суспензии фенхеля (*F. vulgare*) с концентрацией 1×10^6 протопластов на миллилитр.

С использованием метода хемослияния при применении полиэтиленгликоля показана частота слияния протопластов мезофилла листа (*D. carota*) и протопластов каллуса фенхеля (*F. vulgare*) на уровне 46%.

Доказано, что хемослияние является высокоэффективным методом получения бинуклеарных гетерокарионов в количестве, достигающем $4,6 \times 10^4$ ед. при исходном числе протопластов в суспензии 2×10^5 . При этом показано, что жизнеспособность соматических гибридов при инкубировании в питательной среде может достигать 43 дней.

Достоверность результатов исследований. Полученные Алжарамани Насим научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными и обеспечиваются высоким уровнем теоретического и методического обоснования с использованием научных трудов ведущих отечественных и зарубежных ученых. Выбранные методические подходы адекватны, использованы правильно, объем экспериментального материала достаточен. Достоверность результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 148 страницах, состоит из введения, основной части,

заключения, библиографического списка, включающего 155 источника на иностранном языке, содержит 6 таблиц, 44 рисунков. Библиографический список включает 158 источника. В первой главе анализируется литература, в том числе влияние факторов на выделение и слияние протопластов. с оценкой возможности их использования для оптимизации технологии получения соматических гибридов ЦМС. Во второй главе описаны материалы и методы, которыми автор пользовался в процессе выполнения работы. Третья глава включает результаты проведенных исследований, на которых построены выводы диссертационной работы.

Апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 1 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 – в изданиях, входящих в МБД, 4 – статьи в сборниках конференций. Результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на 8-х международных конференциях.

Вопросы и замечания по диссертационной работе:

При изучении диссертационной работы и автореферата Алжарамани Насм возникли некоторые замечания и пожелания:

1. В работе содержится ряд глав с названиями семейств, используемых в работе, рекомендуется оформить их в едином стиле. Так же, в исследовании частое излишнее использование фраз таких как «цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС)» и «морковь *D. carota* L.». Достаточно один раз указать различное использование терминов, далее по тексту использовать одно из определений. В русскоязычных источниках не используются формулировки: «г л-1», «(w/v)». В используемом списке сокращений «ЦМС» расшифрована как «цитоплазматической мужской стерильности». Для верного обозначения химических веществ и гибридов первого поколения рекомендуется использовать подстрочный индекс. В описании исследования присутствуют орфографические, грамматические ошибки и опечатки.

2. В работе успешно получены гибридные клетки, но не показана их дальнейшая судьба и успешность регенерации в гибридные растения. Констатация того, что клетки прожили 43 дня, является ценной, но культура клеток является промежуточным этапом, когда конечной целью является получение регенерантов. Отсутствие данных по частоте полученных каллусов гибридных протопластов, числу растений-регенерантов, может быть воспринято как незавершенность основного эксперимента.

Перечисленные замечания не умаляют научной значимости полученных автором результатов и практической ценности выполненной работы. К очевидным достоинствам работы можно отнести:

1. Несомненным преимуществом работы является подробное описание всех используемых методов и технологий. Данная работа представляет собой самостоятельное, комплексное и высококачественное

научное исследование с четкими результатами и значимой практической ценностью.

2. Большой интерес в данном исследовании представляет детально описанное использование различных техник слияния протопластов. Работа с культурой клеток и тканей *in vitro* является трудоёмкой и требует особых навыков. Получение отдалённых гибридов с использованием протопластов важно и полезно для проведения дальнейших исследований.

Заключение по диссертационной работе. Диссертация Алжарамани Насим по теме «Поиск источников мужской стерильности и разработка методов генетического усовершенствования моркови (*D. carota* L.)» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития селекции и семеноводства растений рода *Ariaseae*. Полученные результаты и выводы являются значимыми для науки и практики. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации. Диссертационная работа отвечает критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» от 24.09.2013 №842, раздел II, п.9-14, а ее автор Алжарамани Насим заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Отзыв на диссертацию заслушан, обсужден и одобрен на научном семинаре Лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», протокол № 11 от 21 ноября 2025 года

Дивашук Михаил Георгиевич,
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
прикладной геномики и частной
селекции сельскохозяйственных
растений,
03.00.15 – Генетика


М.Г. Дивашук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ)», Министерство
науки и высшего образования Российской Федерации.

127550 Москва, Россия, ул. Тимирязевская, 42

Тел: +7 (499) 976-65-44, +7 (499) 977-93-29

E-mail: iab@iab.ac.ru

Подпись

Михаила Георгиевича

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ

«21» ноября 2025 г.