

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора сельскохозяйственных наук, заведующего лабораторией генетики и цитологии ФГБНУ ФНЦО Домблидеса Артура Сергеевича на диссертационную работу **Синицыной Анастасии Александровны** «Усовершенствование методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L.», представленной на соискание учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Актуальность темы диссертационного исследования. Видовое разнообразие рода *Brassica* L. представляет огромный потенциал для производства полезной и качественной овощной продукции как в России, так и в других странах. Селекционная работа, прежде всего, направлена на создание линейного материала с необходимым сочетанием аллелей генов хозяйственно ценных признаков, которые затем объединяются в гетерозисных гибридах F1. Селекция инбредных линий длительна и трудоёмка, и не всегда можно получить материал с достаточной степенью гомозиготности. Одним из решений проблемы было появление возможности получения полноценных растений из клеток микроспор в искусственных условиях *in vitro* культуры. Уже в начале 1980-х годов проведены первые успешные исследования по культуре микроспор капустных культур, на основе которых разработан базовый протокол для культивирования микроспор рапса, который стал основой для получения удвоенных гаплоидов для видов рода *Brassica* L. С практическим использованием биотехнологического метода культуры изолированных микроспор *in vitro* стало возможным значительно ускорить процесс создания гомозиготных линий с высокой генетической выровненности. Несмотря на значительные достижения в области биотехнологии и развития методических положений крайне важными остаются исследования по частным культурам, где много факторов влияют на возможность широкого практического применения данной технологии. Кроме того, в силу межвидовых и внутривидовых различий

в отзывчивости к андрогенезу *in vitro* многие генотипы растений рода *Brassica* L. имеют низкие частоты эмбриогенеза, образования проростков из эмбриоидов и спонтанной диплоидизации, и поэтому требуют поиска способов увеличения эффективности получения образования гаплоидов в культуре изолированных микроспор. Необходимо также отметить, что во всем мире число исследований по усовершенствованию этой технологии и вовлечения большего количества генотипов с практической оптимизацией протоколов для различных видов остаётся пока ещё очень невелико, поэтому подготовленная диссертационная работа Анастасии Александровны обладает несомненной актуальностью с целью усовершенствования методов получения растений удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* сразу у нескольких видов: капусты белокочанной (var. *capitata* L.), капусты кольраби (var. *gongylodes* L.), капусты брокколи (var. *italica* Plenck), капусты листовой (var. *acephala* DC.) и рапса (*Brassica napus* L.).

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Материалы диссертационной работы изложены последовательно и логично. Аналитический обзор литературы освещает все вопросы, связанные с темой диссертации. Научные положения затрагивают наиболее актуальные и важные аспекты в совершенствовании методов получения удвоенных гаплоидов рода *Brassica* L. В работе использованы современные биотехнологические и цитологические протоколы экспериментов для достижения поставленной цели. Сформулированные выводы получены на большом объёме экспериментальных данных с соответствующей статистической обработкой результатов. В рекомендациях представлены методические решения повышения уровня производства линий удвоенных гаплоидов для эффективной селекции капустных культур.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Научная новизна работы заключается в обосновании заключения о том, что очистка и прохождение теплового шока микроспор

капусты белокочанной в 13% растворе сахарозы не снижает частоту эмбриогенеза микроспор и конечный выход УГ капусты белокочанной. Показано, что воздействие на эмбриониды капусты кольраби в течение 3-9 дней температуры 5⁰С увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков с 72,2% до 97,2%. Кроме того, было показано, что гомозиготные генотипы и гетерозиготные генотипы капусты белокочанной имеют эквивалентные доли высоко и средне отзывчивых в культуре изолированных микроспор образцов – 27,3% и 24,5% соответственно.

Результаты, приведённые в диссертационной работе, имеют практическое значение. Выявлены факторы, повышающие отзывчивость изолированных микроспор, а также частоту регенерации и прямого образования проростков из эмбрионидов генотипов *B. oleracea* и *B. napus* в культуре. Оптимизирован метод получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *B. oleracea* за счёт снижения трудоёмкости и стоимости этапов очистки и культивирования микроспор во время теплового шока (48 ч., 32,5⁰С). Эффективность в усовершенствовании методов получения удвоенных гаплоидов подтверждается большим числом полученных эмбрионидов у различных образцов капустных культур, как например 5470 штук на 100 бутонов капусты кольраби. Результаты исследований представлены в пяти научных работах, из которых две в индексируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. Материалы диссертации апробированы на Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 160-летию В.А. Михельсона (г. Москва, 2020) и Всероссийской с международным участием научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 155-летию со дня рождения Н.Н. Худякова (г. Москва, 2021). Оригинальность в методических подходах подтверждена получением патента № 2769815 Российская Федерация, СПК А01Н 4/00(2022.02) по способу создания удвоенных гаплоидов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам учёных степеней и присвоения научным работникам учёных званий. Диссертация является завершённым и цельным научно-исследовательским трудом. Автореферат и диссертация оформлены в соответствии с ГОСТом и отвечают требованиям ВАК РФ (п.п. 9 - 14 «Положение о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842). Автореферат повторяет структуру и полностью отражает содержание диссертационной работы. Полученные научные результаты имеют высокую теоретическую и практическую значимость в области селекции и биотехнологии сельскохозяйственных растений. С применением разнообразных методов исследований достигнута поставленная цель диссертационной работы. Выводы в заключении полностью соответствуют определённым задачам запланированных исследований.

Оценка содержания диссертации. Материалы диссертации изложены на 133 страницах компьютерного текста формата А4 (приложение Microsoft Word), с включением 23 таблиц и восьми рисунков. Список использованной литературы состоит из 182 источников, из которых 171 на иностранном языке. Структура диссертации содержит введение, главу аналитического обзора современных достижений в области получения удвоенных гаплоидов, главу материалов и методов с подробным описанием использованного растительного материала и протоколов экспериментов, главу результатов и обсуждений с проведёнными результатами исследований и их анализом, заключение, список использованных сокращений и библиографический список цитируемой литературы. В первой главе приводится детальное описание и анализ современного состояния изучаемой темы, подробно даны все аспекты использования и развития методов получения удвоенных гаплоидов растений в культуре изолированных микроспор. Обширная глава материалов и методов исследований включает восемь разделов с пятью подразделами, где представлены подробные описания проведения экспериментов по условиям

выращивания донорных растений, условиям культивирования микроспор и полученных эмбриоидов, процессу регенерации и прорастания эмбриоидов, адаптации растений, оценки плоидности. В третьей главе приводятся данные исследований и их обсуждение, где достигается основная цель работы и решаются поставленные задачи. Особое внимание уделено влиянию генотипа на число образовавшихся эмбриоидов, где выявлены группы как высоко и средне отзывчивых, так низко отзывчивых и неотзывчивых генотипов среди различных видов. Показано влияние генотипа на выход растений регенерантов, среди которых максимальную частоту прямого прорастания эмбриоидов наблюдали у капусты брокколи 62,1%. Применение среды с антиоксидантами (аскорбат и глутатион) приводило помимо увеличения частоты эмбриогенеза к стимуляции образования эмбриоидов у неотзывчивого генотипа. Частоту эмбриогенеза также увеличивало добавление цефотаксима на этапе теплового шока изолированных микроспор рапса. Подробно изучено влияние влияния дисахаридов (мальтоза и сахароза), маннитола и теплового шока на частоту эмбриогенеза. У капусты кольраби показано положительное действие обработки пониженной температуры на частоту прямого прорастания эмбриоидов и конечного образования удвоенных гаплоидов.

Замечания и пожелания по диссертационной работе

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

1. Вероятно, следовало бы провести исследования по изучению влияния цефотаксима и путресцина, а также воздействию низких положительных температур на большем количестве генотипов капустных культур;
2. Термин *жизнеспособность* не совсем корректен, скорее нужно говорить об исходной фертильности микроспор, потому что *жизнеспособность* определятся прорастанием уже зрелой пыльцы с образованием пыльцевых трубок, и этот процесс не связан с переключением развития микроспоры с гаметофитного пути на спорофитный. Кроме того, на фотографии на странице 81 показаны окрашенные микроспоры без образования пыльцевых

трубок. На странице 80 упоминается *жизнеспособность* микроспор, когда существует понятие *жизнеспособности* уже зрелой пыльцы;

3. В ходе исследования введён термин *линии высокой степени гетерозиготности*. В данном случае нужно дать пояснения, что имеется ввиду, и какие критерии определяют такой *линейный* селекционный материал? Вероятно, речь идёт о линиях с невысокой степенью инбридинга, тогда стоило бы указать поколения инбридинга;
4. Желательно было бы более подробно охарактеризовать обоснованность подбора исходного селекционного материала, донорных генотипов, их ценность для селекции (устойчивость к биотическим и абиотическим факторам). В результатах и обсуждениях можно было больше проанализировать отзывчивость экспериментальных образцов в сравнении с конкретными генотипами с известной отзывчивостью в культуре изолированных микроспор;
5. В результатах диссертации мало иллюстративного материала, показывающего основные стадии процесса получения растений удвоенных гаплоидов, отсутствуют цитологические фотодокументы (развитие эмбриоидов, хромосомный анализ);
6. Имеются недочёты по оформлению, так рисунок на одной странице, а описание к нему на другой, рисунки 6, 4 и 1; раздробленные таблицы, хотя их размер позволяет расположить их на одной странице, например № 14, 15, 22.

Представленные замечания не снижают значимости и важности проведённого соискателем научного исследования. Проблемы повышения эффективности технологии по созданию линий удвоенных гаплоидов все ещё остаются крайне актуальными для капустных культур. Положительным моментом диссертационной работы является то, что были взяты в сравнении различные виды рода *Brassica* L. и проведён большой объём экспериментов при изучении различных факторов, влияющих на образование и дальнейшее развитие эмбриоидов. Рассмотрено как отдельное, так комплексное влияние условий на процесс эмбриогенеза. Исследование на различных видах позволит

только лучше понять явление андрогенеза *in vitro* и вовлекать в него все большее число ценных генотипов для получения гомозиготных линий с хозяйственно ценными признаками. Данное исследование позволило получить новые знания, которые делают технологию культивирования изолированных микроспор капустных культур *in vitro* ещё более доступной для практической селекции.

Заключение. На основании вышеизложенного диссертационная работа Сеницыной Анастасии Александровны представляет собой законченное и цельное научно-квалификационное исследование, выполненное на высоком методическом уровне, имеющее большую теоретическую и практическую значимость в области современной сельскохозяйственной науки. Уровень выполнения поставленных задач, обоснованность выводов в заключении позволяют утверждать, что диссертационная работа отвечает требованиям установленных п.п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842), а её автор Сеницына Анастасия Александровна заслуживает присуждения учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Домблдес Артур Сергеевич

доктор сельскохозяйственных наук, (06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений), заведующий лабораторией генетики и цитологии,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр овощеводства»

Адрес: 143080 Московская область,
Одинцовский район, п. ВНИИССОК,
улица Селекционная, 14
Тел.: +7 (495) 599-24-42;
e-mail: priemnaya@vniissok.ru

22 мая 2023



Подпись	<i>Домблдес</i>	Засеверяю
Секретарь	<i>Високая</i>	
	<i>22 мая 2023</i>	