

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, советника директора ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» по инновациям и координации НИР Мухиной Жанны Михайловны на диссертацию Сеницыной Анастасии Александровны «Усовершенствование методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L.», представленной на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Актуальность темы диссертационного исследования. В настоящее время одно из основных направлений селекции растений рода *Brassica* L. – гетерозисная селекция с использованием чистых линий, получение которых традиционными методами (инбридинг) требует значительных временных затрат, особенно у двулетних культур. Альтернативный способ получения чистых линий – биотехнологический метод, известный как культура изолированных микроспор *in vitro*, позволяет значительно ускорить процесс создания гомозиготных линий.

Основой получения удвоенных гаплоидов у растений рода *Brassica* L. служит базовый протокол культуры микроспор рапса, позднее модифицированный различными исследователями для получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор капусты белокочанной, кольраби, брокколи и листовой. Однако, из-за генотип-специфичности отзывчивости к андрогенезу многие генотипы растений рода *Brassica* имеют низкие частоты эмбриогенеза, образования проростков из эмбриоидов и спонтанной диплоидизации и требуют поиска способов увеличения конечного выхода удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор.

Таким образом, для масштабирования технологии культивирования микроспор капустных культур в условиях *in vitro* эмбриогенный ответ, принципиально важен.

В этой связи, исследования, проведенные Сеницыной А.А. по изучению влияния различных факторов и усовершенствованию методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L., чрезвычайно актуальны и направлены на повышение эффективности современного биотехнологического метода ускорения селекционного процесса капустных культур.

Новизна исследований и полученных результатов. Диссертантом было проведено комплексное изучение условий культивирования *in vitro* микроспор капустных культур и впервые показано, что изоляция, очистка микроспор и инкубирование во время прохождения теплового шока микроспор капусты белокочанной в 13% растворе сахарозы, рН 5,8, не снижает частоту эмбриогенеза микроспор и конечный выход удвоенных гаплоидов капусты белокочанной.

Получены результаты, демонстрирующие, что гомозиготные и гетерозиготные генотипы капусты белокочанной имеют эквивалентные доли высоко и средне отзывчивых (27,3% и 24,5%, соответственно) в культуре изолированных микроспор образцов.

При изучении факторов, влияющих на образование проростков из эмбриоидов, выявлено, что обработка эмбриоидов капусты кольраби низкими положительными температурами (5°C) в течение 3-9 дней увеличивает частоту их прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков с 72,2% до 97,2%.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Сеницыной Анастасией Александровной в диссертации на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук «Усовершенствование методики

получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L.» проведены исследования на 82 образцах растений рода *Brassica*, включая 5 образцов *B. napus* L., и разновидности *B. oleracea* L.: 56 образцах капусты белокочанной (*B. oleracea* var. *capitata* L.); 4 образцах капусты кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.); 12 образцах капусты брокколи (*B. oleracea* var. *italica* Plenck); 5 образцах капусты листовой (*B. oleracea* var. *acephala* DC.).

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Эксперименты проведены на сертифицированном профильном оборудовании.

Теоретические и практические выводы основаны на результатах отечественных и зарубежных литературных источников и данных многолетних собственных исследований, которые достаточно проанализированы и обобщены.

Диссертация содержит конкретные научные задачи, последовательный план проведения исследований, соответствующий основной теоретической линии, четкую взаимосвязь поставленных целей, задач и выводов.

Соответствие работы требованиям Положения ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям. Научные положения, заключение и рекомендации, изложенные в диссертационной работе и автореферате диссертационной работы Сеницыной Анастасии Александровны, представленной на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук, соответствуют требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук, и по пунктам 1 и 5 соответствуют паспорту специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Содержание диссертации в полной мере отражено в автореферате, основные результаты исследований, по теме диссертационной работы опубликованы в открытой печати.

Оценка содержания диссертации. Среди основных экспериментальных достижений диссертанта в рамках проведенных исследований следует отметить:

- Изучено влияние генотипа на отзывчивость к эмбриогенезу в культуре изолированных микроспор генотипов растений рода *Brassica* L., и, в частности, – гомозиготных и гетерозиготных генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.).

- Дана оценка влияния генотипа на образование проростков из эмбрионов *Brassica*; обнаружена связь прямого прорастания эмбрионов с их морфологической зрелостью.

- Отмечено влияние антиоксидантов (аскорбат и глутатион) на жизнеспособность микроспор и наличие связи между жизнеспособностью микроспор и частотой эмбриогенеза генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор.

- Получены данные о влиянии теплового шока (32,5°C) в сочетании с применением антибиотика (цефотаксим), полиамина (путресцин) на частоту эмбриогенеза, образования проростков из эмбрионов и прямого прорастания эмбрионов генотипов рода *Brassica*.

- Изучено влияние применения растворов дисахаридов (мальтоза, сахароза), спирта (маннитол) во время теплового шока (32,5°C) микроспор на частоту эмбриогенеза, образования проростков из эмбрионов и прямого прорастания эмбрионов генотипов рода *Brassica*.

- Выявлена возможность замены среды B5 на этапе изоляции и очистки микроспор и среды NLN-13 на этапе теплового шока 13%-м раствором сахарозы при культивировании микроспор капусты белокочанной (*B. oleracea* L.).

- Изучены условия культивирования эмбриоидов (*B. oleracea* L.), в частности, влияние фотопериода и температуры на частоту их прямого прорастания.

Таким образом, полученные диссертантом экспериментальные результаты имеют немалую теоретическую и практическую значимости для оптимизации лабораторных протоколов получения удвоенных гаплоидов рода *Brassica* в условиях *in vitro*.

Все вышеизложенное подтверждает высокий научно-методический уровень исследований, достаточную аргументированность и обоснованность рекомендаций автора по использованию метода получения гаплоидных форм и линий из них для дальнейшего использования в селекционных программах капустных культур.

Представленные в диссертационной работе экспериментальные материалы, их анализ и интерпретация свидетельствуют о том, что цель и поставленные задачи выполнены, положения, выносимые на защиту, достаточно аргументированы. Положения, выводы и рекомендации основаны на большом экспериментальном материале, достоверность которого несомненна и подтверждается первичной документацией и статистической обработкой данных современными методами статистики с вероятностью 95 %.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 133 страницах, состоит из введения, основной части, содержащей три главы, 23 таблицы, 8 рисунков, заключения, списка принятых сокращений, библиографического списка, включающего 182 источника, в том числе 171 на иностранном языке.

В первой главе представлен литературный обзор по теме диссертации. Автором на основании анализа научных достижений отечественных и зарубежных ученых убедительно показано, что использование таких биотехнологических приемов как культура пыльников, микроспор или

неоплодотворенных семязачатков для создания линий удвоенных гаплоидов овощных культур является важным инструментом в современной селекции.

В главе «Материалы и методы» детально описан растительный материал, использованный в экспериментах, условия выращивания растений-доноров, методики определения стадии развития микроспор, выделения и культивирования микроспор и эмбриоидов, изучения влияния различных факторов на частоту эмбриогенеза и т.д.

В целом, можно сделать вывод, что диссертантом для выполнения поставленных задач применялись современные методы и способы лабораторных экспериментов, морфологических и цитологических анализов, базовых методов статистического анализа данных результатов наблюдений. Используются общепринятые и современные методы сбора и обработки полученной информации с использованием U-теста Манна-Уитни и коэффициента Спирмена.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены основные результаты, полученные автором в ходе выполнения диссертационного исследования.

- В частности, в результате анализа генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор 56 гомозиготных (удвоенные гаплоиды (ЛУГ), инбредные линии) и гетерозиготных генотипов (F1-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) капусты белокочанной (*B.oleracea*) отмечено, что соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым одинаково.

- Установлена высокая положительная связь ($r = 0,87$) числа морфологически зрелых эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. При этом в результате анализа генотипспецифичности прорастания эмбриоидов на твердой питательной среде диссертантом

убедительно показано, что частота образования проростков из эмбриоидов растений рода *Brassica* была в целом выше, чем в ранее проведенных исследованиях других авторов, и составила 57,9% у капусты белокочанной, 69,9% у рапса, 71,8% у кольраби, до 81,7% у брокколи.

- Показано, что антиоксиданты (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) повышают (в 1,7 раза) частоту эмбриогенеза отзывчивых и способствуют эмбриогенезу неотзывчивых генотипов *B. oleracea*, что объясняется более высоким уровнем жизнеспособности изолированных микроспор, инкубируемых в жидкой питательной среде с антиоксидантами.

- Установлено, что инкубирование изолированных микроспор в питательной среде с цефотаксимом (50 мг/л) на этапе теплового шока в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без цефотаксима) стимулирует эмбриогенез неотзывчивого генотипа *B. oleracea* var. *capitata* L. и существенно (в 3-7 раз) повышает частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков (до 91,7%) и частоту прямого прорастания эмбриоидов (до 60%) *B. napus* L.

- Показано, что инкубирование изолированных микроспор в среде NLN13 с путресцином (0,2-0,5 мг/л) при температуре 32,5 °С в течение 24-48 часов с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 (без путресцина) не влияет на эмбриогенез микроспор и образование проростков из эмбриоидов рапса (*B.napus* L.), однако способствует получению эмбриоидов и растений-регенерантов неотзывчивого к эмбриогенезу генотипа капусты белокочанной (*B.oleracea* var. *capitata* L.).

- При исследовании влияния инкубирования микроспор в растворах дисахаридов (мальтоза 130 г/л, сахароза 130 г/л), спирта (маннитол, 50 г/л) на этапе теплового шока (24 ч., 32,5 °С) показано, что растворы мальтозы

или маннитола полностью ингибируют эмбриогенез микроспор *B. napus* L. и *B. oleracea* L., а раствор сахарозы увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход удвоенных гаплоидов (УГ) *B. napus* L. (не менее чем в 2 раза), но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход удвоенных гаплоидов *B. oleracea* L.

- Отмечено, что использование раствора сахарозы (130 г/л) на этапе изоляции, очистки и инкубирования микроспор во время теплового шока (48 ч., 32,5 °С) с последующей заменой и культивированием микроспор в питательной среде NLN-13 позволяет снизить трудоемкость и стоимость этих этапов, при этом значения частоты эмбриогенеза, частоты образования проростков, частоты спонтанной диплоидизации образцов *B. oleracea* L. сопоставимы со стандартным протоколом.

- Показано, что воздействие низкой положительной температуры (5 °С) на эмбриониды кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes* L.) в течение первых 3 – 9 дней после их пересадки на твердую питательную среду увеличивает частоту прямого прорастания в 2 раза и частоту образования проростков до 94,4-97,2 % .

Замечания и пожелания по диссертационной работе

Вместе с тем, при рассмотрении диссертационной работы и автореферата Сеницыной Анастасии Александровны возникли некоторые замечания и пожелания:

1. Мало иллюстративного материала в виде фотографий, подтверждающих результаты поставленных экспериментов.
2. Вероятно, для повышения надежности полученных экспериментальных данных следовало провести исследования по изучению влияния цефотаксима и путресцина, а также воздействию низких положительных температур на большем количестве генотипов капустных культур, хотя полученные автором результаты, бесспорно, статистически достоверны.

Заключение. В целом, диссертационная работа Сеницыной Анастасии Александровны «Усовершенствование методики получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L.» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решения важных практических и теоретических задач в биотехнологии и селекции растений *Brassica*. Содержание автореферата отражает основные положения диссертации. Рукопись отвечает критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» от 24.09.2013 №842, раздел II, п.9-14, а ее автор Сеницына Анастасия Александровна заслуживает присуждения учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук (06.01.05 – Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений) главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии и молекулярной биологии, советник директора по инновациям и координации НИР ФГБНУ «ФНЦ риса»

19 мая 2023 года

Мухина Жанна Михайловна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр риса»

350921, г. Краснодар, пос. Белозерный, дом 3

E-mail: arri_kub@mail.ru

Телефон: +7 861 205-15-55

Тел./факс: +7 861 229-41-49

Web-site: <https://vniirice.ru>

Подпись Мухиной Жанны Михайловны
заверяю:

Ученый секретарь

К.б.н.



Л.В. Есаулова

19 мая 2023 года