

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ)»,
доктор биологических наук, профессор РАН,



Г.И. Карлов
«24» _____ 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ)» на диссертационную работу Сеницыной Анастасии Александровны на тему: «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) в диссертационный совет 35.2.030.08 на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Актуальность темы.

Капуста белокочанная, кольраби, брокколи – одни из важнейших овощных сельскохозяйственных культур, их ценность обусловлена биохимическим составом, доступностью этого продукта и возможностью хранения и потребления в течение всего года. Капуста листовая широко используется в городском озеленении, особенно в конце лета и осенью, когда цветущие растения уже менее декоративны. Рапс – перспективная масличная культура, площадь возделывания которой в нашей стране стремительно расширяется. В настоящее время особенно важно получать отечественные сорта и F₁-гибриды, производить достаточное количество их семян, причем необходимо как только возможно быстро предложить овощеводам альтернативу семенам сортов и гибридов иностранной селекции.

В диссертации Сеницыной А.А. представлена работа по оптимизации технологии получения удвоенных гаплоидов для использования их в качестве исходного материала для селекции рапса, капусты белокочанной, кольраби, брокколи, листовой. В связи с вышесказанным актуальность рассматриваемой диссертационной работы Сеницыной А.А. не вызывает сомнения, а полученные результаты представляют научную и практическую ценность.

Цель исследований отражает актуальность выбранной темы - изучить влияние факторов на частоту эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор, частоту образования проростков из эмбриоидов, частоту прямого прорастания эмбриоидов растений рода *Brassica*: разновидностей *Brassica oleracea* L., таких как: капуста белокочанная (var. *capitata* L.), капуста кольраби (var. *gongylodes* L.), капуста брокколи (var. *italica* Plenck), капуста листовая (var. *acephala* DC.) и рапса (*Brassica napus* L.)..

Автором были поставлены следующие задачи: изучить генотипспецифичность эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор гомозиготных (ЛУГ, инбредные линии) и гетерозиготных (F₁-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности) генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.); изучить генотипспецифичность образования проростков из микроспорогенных эмбриоидов *Brassica* и связь прямого прорастания эмбриоидов с их морфологической зрелостью; изучить влияние антиоксидантов (аскорбат и глутатион) на жизнеспособность изолированных микроспор и частоту эмбриогенеза отзывчивых и неотзывчивых генотипов капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор; изучить влияние антибиотика (цефотаксим), полиамина (путресцин), дисахаридов (мальтоза, сахароза), спирта (маннитол) на этапе теплового шока (32,5°C) изолированных микроспор *Brassica* на частоту микроспорогенного эмбриогенеза, образования проростков из эмбриоидов и прямого прорастания эмбриоидов; изучить влияние замены среды B5 на этапе изоляции и очистки микроспор и среды NLN-13 на этапе теплового шока 13%-м раствором сахарозы на частоту эмбриогенеза, частоту образования проростков и частоту спонтанной диплоидизации капусты белокочанной (*B. oleracea* L.) в культуре изолированных микроспор; изучить влияние воздействия низкой положительной температуры (5°C) на микроспорогенные эмбриоиды (*B. oleracea* L.) на частоту их прямого прорастания.

Научная новизна работы состоит в том, что диссертантом впервые показано, что замена питательной среды NLN-13 на 13% раствор сахарозы при выделении микроспор и проведении высокотемпературного шока у капусты белокочанной позволяет снизить затраты реактивов, времени и труда.

Выявлен способ получения большего количества растений-регенерантов при проращивании эмбриоидов капусты кольраби – культивирование эмбриоидов при пониженной температуре 5°C в течение 3-9 суток.

Впервые показано, что ЛУГ, инбредные линии и F₁-гибриды, линии высокой степени гетерозиготности капусты белокочанной имеют схожие

доли высоко и средне отзывчивых в культуре изолированных микроспор образцов – 27,3% и 24,5% соответственно.

В результате культивирования изолированных микроспор получена коллекция растения-регенерантов рапса, капусты белокочанной, капусты кольраби, капусты брокколи.

Теоретическая и практическая значимость. Проведенный соискателем анализ генотипспецифичности эмбриогенной отзывчивости в культуре изолированных микроспор 56 образцов капусты белокочанной столовой показал, что соотношение высоко и средне отзывчивых к низко и неотзывчивым одинаково для гомозиготных 27,3/72,7% и гетерозиготных 24,5/75,5% образцов. Выявлена положительная корреляция ($r=0,87$) числа нормально выглядящих эмбриоидов с числом эмбриоидов, прорастающих прямым путем. Показано, что антиоксиданты (аскорбат, 20 мг/л и глутатион, 20 мг/л) повышают уровень жизнеспособности микроспор, и, как следствие, частоту эмбриогенеза образцов капусты белокочанной. На основании проведенных соискателем исследований выявлено, что добавление в среду для культивации микроспор на этапе теплового шока 50 мг/л цефотаксима обеспечивает значимое повышение частоты эмбриогенеза (в 3-7 раз), частоты образования проростков (до 91,7%) и частоту прямого прорастания эмбриоидов (до 60%) у рапса и индуцирует эмбриогенез микроспор капусты белокочанной. Установлено, что после добавления в среду NLN-13 0,2-0,5 мг/л путресцина возможно получение эмбриоидов и растений-регенерантов неотзывчивого образца капусты белокочанной. Выявлено, что на этапе прохождения теплового шока растворы мальтозы или маннитола полностью ингибируют эмбриогенез микроспор капусты белокочанной и рапса, а раствор сахарозы значимо увеличивает частоту эмбриогенеза и конечный выход удвоенных гаплоидов (УГ) рапса, но не оказывает значимого влияния на частоту эмбриогенеза и конечный выход УГ капусты белокочанной. Показана возможность стимуляции прямого прорастания эмбриоидов капусты кольраби путем воздействия низкой положительной температуры (5°C) в течение первых 3-9 дней после их пересадки на твердую питательную среду, что увеличивает частоту прямого образования проростков из эмбриоидов в 2 раза.

Достоверность результатов исследований. Полученные Сеницыной А.А. 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 U-теста Манна-Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа построена по классическому плану, изложена на 133 страницах, состоит из введения, основной части, заключения, списка принятых сокращений. Иллюстративный материал включает 23 таблицы, 8 рисунков. Библиографический список состоит из 182 источников, включающих 171 работу зарубежных авторов.

Во введении автором обоснована актуальность изучаемой темы, четко сформулирована цель и поставлены задачи исследования. Полученный экспериментальный материал позволил соискателю обозначить степень научной новизны, а также грамотно сформулировать основные положения диссертации, выносимые на защиту.

В первой главе «Обзор литературы» представлен подробный анализ мирового опыта использования гаплоидных технологий у капустных культур и факторов, влияющих на успех получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор.

Во второй главе «Материалы и методы» отражены условия, материал и методология исследований. Подробно изложены составы питательных сред, использованные антиоксиданты, антибиотики и полиамины, параметры температурных режимов и освещенности, уровней рН. Автором приведена методика определения плоидности растений-регенерантов. Анализ содержания и структуры этого раздела позволяет дать высокую оценку научно-методического уровня проведения работ.

В третьей главе содержатся результаты экспериментальных исследований, включающие подробный анализ полученных данных, оценку влияния генотипа донорного растения, антиокислителей, антибиотиков и полиаминов в составе питательной среды, различных сахаров на эмбриогенез в культуре микроспор, сравнение эффективности проращивания эмбриоидов в различных условиях.

Заключение диссертации представлено конкретными выводами, сформулированными в логической последовательности по основным защищаемым положениям.

Автореферат в полной мере отражает основные результаты диссертационного исследования.

Апробация работы. Материалы диссертации прошли апробацию двух научных конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 2 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Вопросы и замечания по диссертационной работе:

1. Не совсем понятно, как были выбраны образцы растений для работы, почему использовали именно эти селекционные образцы и F₁-гибриды.

2. Интересно было бы сравнить эффективность использования растворов с разными концентрациями сахарозы и мальтозы при выделении микроспор и проведении температурного шока.

3. Не во всех проведенных автором экспериментах присутствуют данные о регенерации и/или удвоении полученных растений-регенерантов

4. В диссертации найден ряд ошибок, связанных с употреблением терминологии:

Стр.6 «оптимальных условий культивации»: термин «культивация» относится к поверхностной обработке почвы, в контексте выращивания растительных клеток в питательной среде применим термин «культивирование», который автор и использует далее по тексту;

Стр.6, 47 «удвоение гаплоидов»: было бы правильнее использовать термин «удвоение хромосом полученных гаплоидов» или «удвоение генетического материала», используемые автором в остальном тексте;

Стр.24 «поточной цитометрии»: метод правильно называется «проточная цитометрия».

Стр.47 По отношению к гаплоидам вернее использовать термин «дигаплоидизация», а не «диплоидизация», так как происходит не восстановление диплоидного набора хромосом, у удвоение гаплоидного.

5. Имеется ряд ошибок в склонениях существительных: стр.27 «эмбриогенез обычно индуцируются»; стр.28 «плазматических мембраны»; стр.28 «что способствуют», вместо «что «способствует».

6. Имеется ряд опечаток: на стр. 25 пропущена буква «с» в слове «микроспор» в названии заголовка и в первой строчке главы 1.7; на стр. 28 два предлога перед существительным «для у растений»; на стр. 31 нитратный ион указан без знака заряда; на стр.39 в слове «оцветающих» пропущена буква «т»; на стр. 43 вместо «MS» указано «MSm»; на стр. 52 размер ячеек фильтра сначала обозначается в «мкм», а на стр. 53 в «µm».

7. Индекс «1» в обозначении гибридов первого поколения следует ставить в подстрочном регистре

8. В отдельных частях нарушена вёрстка: на стр. 76-77, 85-86, 92-93 – подписи к рисункам 1, 4, 6 оторваны от самих рисунков; на стр. 64-65 – примечание к таблице 3 оторвано от самой таблицы.

9. В материалах и методах отсутствует методика определения оценки жизнеспособности микроспор при использовании различных антиоксидантов с помощью окрашивания.

Заключение по диссертационной работе. Перечисленные замечания не умаляют значения проведенного исследования, её научной и практической значимости. Диссертация Сеницыной А.А. на тему «Усовершенствование методики получения удвоенных гаплоидов в

культуре изолированных микроспор растений рода *Brassica* L.» представляет собой завершенную научную работу, выполнена на актуальную тему, характеризуется научной новизной, имеет теоретическую и практическую значимость. Основные результаты опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Диссертационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, а ее автор Сеницына Анастасия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Отзыв рассмотрен и обсужден на заседании лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений 24 мая 2023 года, протокол №7.

24 мая 2023 г.

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

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

Заверяю: с.к.в.а.

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ

«24»

мая

2023 г.