

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА ДОКТОРА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК, ЗАВЕДУЮЩЕГО ЛАБОРАТОРИЕЙ ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЛОГИИ ФГБНУ ФНЦО ДОМБЛИДЕСА АРТУРА СЕРГЕЕВИЧА НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ СОЛОВЬЕВОЙ ЮЛИИ АЛЕКСАНДРОВНЫ «ИЗУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РАСТЕНИЙ РОДА *CUCURBITA* 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. Без таких важных культур, как кабачок (*Cucurbita pepo* L.), тыква крупноплодная (*Cucurbita maxima* Duch.) и тыква мускатная (*Cucurbita moschata* Duch.) трудно представить полноценный рацион питания, производство которых в России входит в пятерку лидирующих в мире. Представленная диссертационная работа посвящена разработке современных методов селекции, которые значительно ускоряют производство линейного материала, а именно технологии получения удвоенных гаплоидов, и также перспективному методу отдалённой гибридизации, где происходит передача важных в хозяйственном отношении признаков от одного вида другому. Несмотря на ряд научных работ в этой области в нашей стране и зарубежом считать эти подходы широко доступными и полностью разработанными для нужд и требований современной селекции пока невозможно, поэтому научные исследования, проводимые в данном направлении и представленные в диссертации Соловьевой Юлии Александровны остаются актуальными и востребованными для продвижения селекционных программ культурных видов *Cucurbita pepo* L., *Cucurbita maxima* Duch., *Cucurbita moschata* Duch.

Известно, что использование биотехнологических методов по получению растений из клеток гаметофита (в данном случае женского) позволяет создать полностью гомозиготные линии за более короткий срок, и с меньшими

трудозатратами, чем требуется при традиционном принудительном самоопылении. Гетерозисные гибриды F1 могут сочетать в себе ценные признаки от подобранных ценных гомозиготных линий. Задача передачи важных в хозяйственном отношении признаков, таких как женский тип цветения, находит решение с использованием технологии межвидовой гибридизации.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Содержание диссертационной работы логично структурировано и изложено. Обзор литературы освещает все современные аспекты производства удвоенных гаплоидов кабачка (*C. pepo* L.), тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.). Большое внимание в целях и задачах исследования уделяется методу межвидовой гибридизации между *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch.

Исходя из актуальности темы и высокой перспективности проведенной работы все научные положения отличаются обоснованностью и возможностью реализации с использованием современных методов биотехнологии растений. Выводы в заключении соответствуют тем задачам, которые перед собой поставил автор для достижения общей цели работы. В результате проведенных исследований получены методические решения для оптимизации и развития производства удвоенных гаплоидов для селекции.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Результаты получены на большом объеме лабораторных и полевых экспериментов, где обработку данных осуществляли с использованием статистических пакетов SPSS Statistics на основе однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа. Достаточное число перспективных для селекции генотипов в качестве доноров эксплантов, большое число вариантов сред для культивирования и влияние их отдельных компонентов, стрессы и обработки были рассмотрены в ходе экспериментов, что

подтверждает глубокую проработку темы диссертационной работы. Обращено внимание как на общие, так и частные факторы, которые могут влиять на конечный результат при получении гиногенных растений. Научная новизна заключается в том, что впервые изучено влияние светового режима во время термической обработки на индукцию гиногенеза, где проанализирован разнонаправленный эффект этих факторов на культивирование семязачатков кабачка (*C. pepo* L.), тыквы крупноплодной (*C. maxima* Duch.) и тыквы мускатной (*C. moschata* Duch.). Использование несвойственной для культивирования *in vitro* тыквенных культур среды В5 позволило улучшить частоту прямого эмбриогенеза *C. maxima* Duch. Замена агара на фитогель также способствовало увеличению частоты прямого эмбриогенеза у кабачка (*C. pepo* L.). Для всех изучаемых видов показано, что добавление в индукционные питательные среды гидролизата казеина вызывает значительное повышение индукции гиногенеза с увеличением частоты прямого гиногенеза. Достоверно показано, что отсутствует реакция культивируемых эксплантов кабачка и тыквы мускатной на изменение аминокислотного и пептидного состава индукционной среды СВМ. В культуре семязачатков кабачка и тыквы крупноплодной установлено, что осмотический стресс, вызванный добавлением манитола в индукционную среду приводит к снижению гиногенеза, также как и добавление пантотената кальция в концентрации 0,5 мг/л. Установлен доминантный характер наследования женского типа цветения при проведении отдаленных скрещиваний между (*C. maxima* Duch.) и тыква мускатная (*C. moschata* Duch.). Помимо научной новизны работы нужно также отметить значительную теоретическую и практическую значимость, где показана различная реакция трёх видов *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. на режимы температурной предобработки, установлена высокая генотипспецифичность внутри каждого вида. Для практического использования проведена работа по влиянию типа экспланта, как фрагменты завязи, мацерированные сегменты, изолированные семязачатки на частоту образования гиногенных структур, и сделаны рекомендации о целесообразности

использования семязачатков и мацерированных сегментов. Добавление в индукционную среду гидролизата казенина, изменение концентрации сахарозы, переход на среду В5 в качестве индукционной значительно оптимизировали получение растений удвоенных гаплоидов кабачка. С теоретической точки зрения установлен доминантный характер наследования женского типа цветения при оценке растений полученный при прямых и обратных скрещиваниях видов *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. В результате скрещиваний в итоге получено 11 ценных межвидовых гибридных растений, которые могут быть использованы в дальнейшей селекции. Результаты исследований представлены трёх сборниках научных трудов в трёх научных публикациях, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации апробированы на двух международных и двух всероссийских конференциях. Подана одна заявка на выдачу патента на изобретение.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам учёных степеней и присвоения научным работникам учёных званий.

По степени выполнения поставленной цели исследования, научным выводам, новизне, практической и теоретической значимости представленная диссертация может быть рассмотрена как цельное, последовательное и самостоятельное научное исследование. Автореферат и диссертация оформлены в соответствии с ГОСТом и отвечают требованиям ВАК РФ (п.п. 9-14 «Положение о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842). Автореферат полностью отражает структуру и содержание диссертации. Актуальность поставленной цели, использование надлежащих и современных методов для решения поставленных задач, выводы в заключении соответствуют уровню исполнения кандидатских диссертаций.

Оценка содержания диссертации. Большая часть диссертации посвящена аналитическому обзору литературы, глава 1 и методической части

исследований, глава 2, все вместе более 70-ти страниц компьютерного текста. Общий объем диссертации составляет 141 страницу, где данные содержат 16 таблиц и 22 рисунка, есть 2 приложения. Список использованных источников содержит 163 наименования. В главе обзор литературы приведены все основные аспекты, касающиеся морфологии изучаемых видов, биологии цветения, селекционных задач. Большое внимание уделяется многим методическим вопросам технологии культивирования изолированных тканей и клеток *in vitro*: генотип донорного растения, предобработки и термические обработки при культивировании, условия культивирования, тип экспланта для введения в культуру, компоненты питательных сред, состав регуляторов роста. Обширная глава «Материалы и методы» предлагает детальное описание схемы экспериментов с условиями культивирования, режимами предобработки и термической обработки, светового режима, влиянием концентраций сахарозы, желирующих агентов, регуляторов роста, аминокислотно-пептидного состава, гидролизата казеина, маннитола, пантотената кальция. Спланированы эксперименты по отдалённой гибридизации с использованием технологии спасения зародыша. Полученные через культуру семязачтков растения планировали оценить морфологически в поколении от самоопыления, проводили цитологический анализ ploидности и оценивали пыльцу гибридных комбинаций.

В третьей главе приводятся результаты научных исследований, согласно поставленной цели диссертационной работы и задачам. Получены данные по температурной предобработке завязей и температурной обработки изолированных семязачтков. Установлено влияние светового воздействия с 16-ти часовым периодом на процесс культивирования изолированных семязачтков. Проведено изучение различной видовой реакции на изменение светового режима культивирования во время термической обработки при 32°C, где у 80% образцов кабачка наблюдали увеличение случаев прямого эмбриогенеза при 16-часов световом периоде. Исследования по использованию различных питательных сред показали, что среда В5 положительно влияла на

развитие гиногенеза практически у 71,5% образцов кабачка и у всех образцов тыквы крупноплодной. Небольшое повышение концентрации сахарозы (до 40 г/л) улучшало индукцию гиногенеза у более чем половины образцов кабачка. Проведено изучение использования различных стимуляторов роста для индукции геногенеза из семязачатков, таких как TDZ и 2,4-D. Показано положительное действие гидролизата казеина (500 мг/л) на формирование гиногенных структур для всех изучаемых видов. Проведён сравнительный анализ цветения, соотношения образования мужских и женских цветков у форм межвидовых гибридов между *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. В результате проведения реципрокных скрещиваний получены данные о закономерностях наследования женского типа цветения. Выращены ценные гибридные формы. В заключении приводятся обширные выводы по каждой подглаве с кратким описанием основных результатов. В приложении представлен подробный состав питательных сред для получения гиногенных растений и подтверждающий документ о регистрации и приёме заявки на патент.

Замечания и пожелания по диссертационной работе

Вместе с тем, при изучении диссертационной работы и автореферата Соловьевой Юлии Александровны возникли некоторые замечания и пожелания.

В качестве общего пожелания хотелось, чтобы литературный обзор был бы более аналитическим. В диссертации в первой главе литературного обзора как правило цитируется автор, или авторы, и далее по тексту, приводится краткое содержание основных идей приведённых исследований. Было бы лучше, если был бы проведён анализ по каждому аспекту на основании анализа общей тенденции научных исследований в этом направлении, подкреплённых предыдущими работами. В данном случае приведённые научные факты остаются несколько разрозненными и не связанными.

В литературном обзоре и в результатах исследований мало упоминается о самом процессе гиногенеза растений, и в частности у тыквенных культур, как процесса спорофитного развития из клеток зародышевого мешка. Не

приведены данные о том, как влияет стадия развития зародышевого мешка на индукцию гиногенеза.

Очень перспективная часть по получению межвидовых гибридов среди изучаемых видов, но в литературном обзоре и в результатах можно было немного расширить эту тему, привести более подробное описание полученных растений, например фазы роста, цветение, форма куста и т.д. Желательно можно было более развёрнуто описать технологию спасения зародышей *in vitro*. Такая информация только обогатила бы общее направление цели работы и практического использования биотехнологии в селекции тыквенных культур.

Вызывает вопрос об использовании фрагментов завязи при культивировании *in vitro*, так как достаточно фактов о том, что это оказывает как правило угнетающее действие на процесс гиногенеза. Пораненные ткани, и часто, сами семязачатки при нарезке завязи могут стимулировать образование только каллусных структур из соматических клеток.

По результатам исследований не совсем понятно процедура проведения дисперсионного анализа во многих таблицах, например с номерами 6-12. Если в случае двухфакторного дисперсионного анализа желательно привести долю влияния фактора, так как в некоторых случаях ошибка (т.е. влияние случайных факторов) может быть очень высокой, тогда делаем вывод о влиянии дополнительных факторов, что часто встречается в биологических экспериментах. Во всех таблицах приведены значения частоты образования гиногенных структур. Если мы говорим о частотах, то это фактор повторяемости значения, или может быть какая-то доля от целого значения, в случае, если это обозначает именно число индуцированных семязачатков или эмбриоидов, то это абсолютное значение. В таблицах 5 и 7 в некоторых местах не показана существенная разница, между значениями.

В цитологической части исследований по рисунку 11 трудно судить об уровне пloidности изучаемых объектов, так как хромосомы находятся в слабо скрученном состоянии. Необходимо поймать при изучении стадию поздней профазы, метафазы при митотическом делении клеток. Действительно нужно

признать, что хромосомный анализ тыквенных культур вызывает трудности в силу очень малого размера и большого числа. При изучении пыльцы растений межвидовых гибридов желательно бы предоставить данные о доле фертильных пыльцевых зёрен у гибридов. Слипшиеся конгломераты пыльцевых зёрен часто могут быть причиной стерильности в силу недоразвития оболочки пыльцы, как можно увидеть сходные образования на рисунке 22В. Фертильность межвидовых гибридов также остаётся очень важной задачей для прямого использования таких растений в селекции.

В литературном обзоре и в целом в диссертации не был затронут важный вопрос о процессе диплоидизации при получении растений удвоенных гаплоидов через культуру изолированных семязачатков, при данной технологии у тыквенных культур имеет место спонтанное удвоение хромосом, которое может приводит к получению растений с различным уровнем ploидности, не только удвоенных гаплоидов. При разработке данной технологии необходимо учитывать данный факт, так как задача состоит в получении именно гомозиготных линий удвоенных гаплоидов.

Указанные выше замечания и пожелания несущие рекомендательный характер не снижают общей научной ценности и практической значимости реализованных автором исследований. Собрано и проанализировано достаточно научной информации по теме диссертации, проверен большой объем экспериментов, на основании которых изучены практически все основные факторы влияющие на развитие гиногеногенза *in vitro* для трёх видов *C. pepo* L., *C. maxima* Duch. и *C. moschata* Duch. Детально рассмотрено влияние каждого фактора не только между видами, но и внутри вида. Полученные результаты позволяют создать и рекомендовать протокол для массового получения линий удвоенных гаплоидов для задач селекции. Внимание также уделено серьёзной проблеме по получению межвидовых гибридов, которые могут использованы как источники ценных признаков. Отработана технология получения гибридизации с использованием метода спасения зародыша *in vitro*.

Полученные автором знания могут послужить для дальнейшего развития современной сельскохозяйственной науки.

Заключение. Диссертационная работа Соловьевой Юлии Александровны на тему «Изучение и оптимизация технологии производства удвоенных гаплоидов растений рода *Cucurbita* L.» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на высоком методическом уровне, обладающую научной новизной, практической и теоретической значимостью. Диссертационная работа отвечает всем критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», а её автор, Соловьева Юлия Александровна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Официальный оппонент,
Домблидес Артур Сергеевич
доктор сельскохозяйственных наук
(06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений),
заведующий лабораторией
молекулярной генетики и цитологии,
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр
овощеводства»



Подпись Домблидес заверяю
секретарь Внескина
02 12 2024 г.

Адрес: 143080 Московская область,
Одинцовский г.о., п. ВНИИССОК,
улица Селекционная, 14
Тел. +74955992442;
e-mail: priemnaya@vniissok.ru

2 декабря 2024 г.