

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. - селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Овощные культуры занимают особое место в полноценном питании человека, являясь источниками витаминов, минеральных и биологически активных веществ. Корнеплоды редиса относятся к низкокалорийным продуктам (14 - 22 кКал), содержат витамины (В1, В2, РР, С), микро- и макроэлементы (калий, натрий, кальций, магний, железо).

В настоящее время востребованным направлением в селекций большинства сельскохозяйственных культур является создание гетерозисных F1-гибридов. Методы традиционной селекции, позволяющие создавать чистые линии у двулетней культуры, это инбридинг и отбор на протяжении минимум 4–6 поколений, что занимает 8–12 лет. Технологии производства удвоенных гаплоидов позволяют сократить процесс создания чистых линий до 4 лет. Наиболее распространенной технологией производства удвоенных гаплоидов у представителей семейства Brassicaceae является технология культивирования пыльников и микроспор (андогенез).

Поэтому работа Козарь Е.В. по разработке технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, является актуальной.

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые изучены все этапы андрогенеза редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной среды, режим термообработки).

На основе проведенных исследований автором разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и получены ДН-линии этой культуры, выделено три ДН-линии и получено их семенное потомство R0, которое включено в работу по созданию линейного материала для гибридов F1.

Результаты работы доложены и обсуждены на 10 международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, 4

работы в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science. Поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН-линиям редиса европейского.

Автор повел большую разностороннюю работу, но по автореферату диссертационной работы возникли замечания и пожелания:

1. В тексте автореферата нет сведений о количестве проанализированных бутонов (табл. 1 с.8), не указана концентрация микроспор (рис. 1 с. 9, табл. 2 и рис. 2 с. 10, табл. 4 с. 11).

2. Не ясно, что автор понимает под термином «урожайность эмбриоидов» (табл. 3 с. 11).

3. По тексту автореферата желательно бы выделившиеся варианты (гормональный состав питательной среды, способ выделения микроспор, способ посадки микропобегов и т.д.) представить без сокращений.

Считаю, что по объему, методическому уровню выполненных исследований, актуальности, новизне и практической ценности полученных результатов, диссертационная работа «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Козарь Е.В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. - селекция, семеноводство и биотехнология растений.

02.12.2022 г.

Кандидат сельскохозяйственных наук
(06.01.05 - селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений)

Азопкова
Марина Александровна

Место работы: Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства», должность – научный сотрудник отдела биотехнологии и инновационных проектов.

140153, Россия, Московская область, Раменский район, д. Верея, стр. 500,
телефон: 8 (495) 558-45-22 e-mail: vniioh@yandex.ru

Подпись М.А. Азопковой заверяю.

Начальник отдела кадров
ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО

Тарновская А.А.



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны «РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО (*RAPHANUS SATIVUS L.*) В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Данная работа посвящена актуальным вопросам изучения андрогенеза и разработки ИМС технологии для РЕ. Цель исследования: разработка технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* РЕ для создания линейного материала.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные новые сведения о паттернах формирования эмбриогенных структур при андрогенезе РЕ расширяют теоретические знания биологии эмбриогенеза в целом. Предложенный оригинальный способ изоляции микроспор позволяет повысить эффективность ИМС технологии, как для РЕ, так и для других культур семейства Brassicaceae. Разработанный принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывает перспективы для разработки новых способов индукции ризогенеза различных культур, как в рамках ДН-технологий, так и в других технологиях, где необходим этап укоренения растений *in vitro*. Применение в селекционных программах разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* позволяет ускорить создание родительских линий гибридов F₁ в четыре-шесть раз по сравнению с традиционными методами селекции. Полученные ДН-линии РЕ являются ценным материалом для создания родительских линий гибридов F₁ и могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 2 в рецензируемых научных журналах в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, 5 работ рецензируемых Scopus, Web of science, 6 в сборниках докладов и тезисов, в том числе поданы заявки на 3 патента на ДН-линии редиса европейского: «Жегалов», «Веня», «Персей» и патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicace.

При изучении автореферата возник ряд вопросов:

1. Было изучено влияние состава питательных сред на эмбриогенез разных генотипов редиса европейского, выход эмбриоидов получился довольно низкий 2,15-2,35%. Почему в работе не применялись гормоны роста?
2. Чем объясняется низкая эффективность ауксинов для укоренения побегов и высокая эффективность применения 0,1 мг/л кинетина в жидкой

питательной среде МСм для укоренения побегов и снижения образования корнеплодоподобных структур?

3. С чем связано спонтанное удвоение хромосом растений-регенерантов редиса европейского?

В целом автореферат по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»), а ее автор – Козарь Елена Викторовна заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Научный сотрудник
лаборатории клеточной селекции,
кандидат с.-х. наук по специальности
06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

О. А. Некрасова

Должность, ученую степень
и подпись О. А. Некрасовой удостоверяю,
ученый секретарь, кандидат с.-х. наук



А. В. Гуреева

05.12.2022 г.

Некрасова Олеся Андреевна, научный сотрудник лаборатории клеточной селекции Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Аграрный научный центр "Донской". 347740, Ростовская область, Зерноградский район, г. Зерноград, Научный городок, д. 3, тел./факс: (863-59)41-4-68, e-mail: vniizk30@mail.ru. Кандидат сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений.

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока
им. А.К. Чайки»

(ФГБНУ «ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки»)

Воложенина ул., д. 30, пос. Тимирязевский, г. Уссурийск, Приморский край, 692539. Тел. (4234) 39-27-19, факс (4234) 39-24-00.
<http://primnii.ru>; e-mail: fe.smc_rf@mail.ru. ОКПО 00668206, ОГРН 1022500864099, ИНН/КПП 2511032119/251101001

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны
«Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского
(*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 4.1.2 –
Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Овощеводство – отрасль сельского хозяйства, требующая повышенного внимания в России из-за недостаточной обеспеченности ее продукцией. Разные виды Brassicaceae в наших широтах занимают большую долю в потреблении населением. Редис просто многие любят. В РФ ощущим недостаток высокоурожайных сортов и семян овощных культур собственной селекции. В этой связи актуальность исследований не вызывает сомнений.

Работа Козарь Е.В. посвящена пребридинговым исследованиям *Raphanus sativus* L., направлены на отработку методики андрогенеза *in vitro* на примере четырех отзывчивых сортов. Результатом стал протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro* (полный цикл от растений доноров до удвоенных гаплоидов), фундаментальные знания по эмбриогенезу вида.

Исследование Е.В. Козарь считаем достаточно объемным, целостным, законченным, хоть и с маленьким практическим выходом в селекцию в виде трех линий удвоенных гаплоидов. Очень понравился графический материал, рисунки емкие и информативные.

Вместе с тем в автореферате отмечены некоторые недочеты:

1. В актуальности темы заявлена культура Редис европейский. Такого вида не существует. Согласно диссертации автора объектом исследования выбран *Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *radiculata* (Pers.) Sazon. Понятно желание, сократить всю легенду. Если действительно существует потребность акцентироваться на разновидности Редис европейский, необходимо в материалах и методах подробно дать название объекта исследования, а далее пользоваться сокращенным названием *R. sativus*, но не РЕ. Кстати, слово «*radiculata*» с латыни не переводится как «европейский».

Использование русских терминов в наших и англоязычных статьях порождает еще большие ботанические коллизии. В этой связи соискателю ученой степени кандидата **биологических** наук необходимо подойти к использованию названия вида (хоть и сельскохозяйственного) аккуратнее. Латынь потому и востребована до сих пор, что действительно помогает найти общий язык ученым.

2. В автореферате впервые латинское название вида приведено на стр. 6 как *R. sativus* L. При первом упоминании вида в тексте необходимо писать полное родовое название, видовое название и автора вида: *Raphanus sativus* L. Нельзя сказать, что Елена Викторовна этого не знает, ведь с списке опубликованных ею работ вид указан верно. Второе и последующие написания в тексте сокращается до первой буквы рода, видовое название без автора: *R. sativus*.

3. Не понятна задача 5 «Провести инбридинг растений-регенерантов для получения ДН-линий – исходного материала для селекции». Инбридинг приводит к увеличению гомозиготности, удвоенные гаплоиды полностью гомозиготны. Масло масляное. Тем более, что из текста автореферата не ясно, как решена эта задача. Она выполнена?

4. Основное положение, выносимое на защиту, №2 «Разработка новых...» – это процесс. Защищают результат. Второе и четвертое положения перекликаются. Из текста автореферата вижу методику получения удвоенных гаплоидов *Raphanus sativus* L. subsp. *sativus* convar. *radiculata* (Pers.) Sazon. в культуре *in vitro* микроспор, позволяющая ускорить создание гомозиготных линий в 2-4 раза.

5. Первая рекомендация по практическому применению трудно реализуема на практике. Для практической селекции андрогенные технологии применяются главным образом на гибридах F₁, если не пошли в культуре гибриды первого поколения, то используют F₂. Когда идет массовое введение десятков гибридов в культуру *in vitro*, уже не до рекогносцировочного определения. Работы по отработке методики для того и нужны, чтобы потом их просто применять.

Отмеченные замечания не снижают ценности исследований и полученных результатов. Мелкие недочеты характеризуют автора как еще молодого ученого, который действительно **самостоятельно** выполнил работу на 85%.

Высокий научно-методический уровень, актуальность, теоретическая и практическая значимость результатов, аргументированность полученных выводов не вызывают сомнения. Опубликовано весомое количество научных работ. Диссертационная работа Козарь Елены Викторовны **отвечает** требованиям положения «О порядке присуждения ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям; автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Илюшко Марина Владиславовна

Ведущий научный сотрудник лаборатории с.-х. биотехнологии
ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий
Дальнего Востока им. А.К. Чайки»,
кандидат биологических наук по специальности 03.00.05 – ботаника (диплом
КТ №040012),
доцент по кафедре земледелия и растениеводства (Аттестат ДЦ №047271)
Тел. +7 950 28 40 983,
e-mail: ilyushkoiris@mail.ru

Подпись М.В. Илюшко ведущего научного сотрудника
лаборатории с.-х. биотехнологии Федерального бюджетного научного
учреждения «Федеральный научный центр агrobiотехнологий Дальнего
Востока имени А.К. Чайки», кандидата биологических наук, заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий
Дальнего Востока им. А.К. Чайки»,
канд. сельскохозяйственных наук



С.Н. Иншакова

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации
Козарь Елены Викторовны

«РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО (*RAPHANUS SATIVUS* L.) В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*»

на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности

4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* (андрогенез, isolated microspore culture – ИМС) занимает ведущее место в селекционных программах по ускорению создания гибридов F₁. В крупнейших иностранных селекционных кампаниях (Syngenta, Bayer и др.) для ряда сельскохозяйственных культур получение удвоенных гаплоидов поставлено на конвейерную основу. Тем не менее, универсальных ИМС протоколов не существует, и многие овощные культуры остаются неотзывчивыми к андрогенезу. Редис европейский – одна из таких культур в семействе *Brassicaceae*. До настоящего времени не было сведений об успешном завершении полного цикла получения удвоенных гаплоидов редиса европейского и отсутствовали фундаментальные исследования по изучению этапов андрогенеза в условиях *in vitro*, позволяющих определить основные причины и пути преодоления его низкой отзывчивости.

Диссертантом при выполнении исследований выявлено, что эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* имеет ряд особенностей биологического развития, ранее не отмеченных для других культур семейства *Brassicaceae*. Получены новые сведения о паттернах формирования эмбрионных структур при андрогенезе редиса европейского, найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологии редиса европейского на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза, что и определяет оригинальность данной работы.

Кроме того, разработанная технология получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* позволит ускорить создание исходного гомозиготного материала для гибридов F₁. Автором работы получен патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства *Brassicaceae*» (заявка № 2022114090/10 (029482) от 25.05.2022 г.).

К автореферату имеются замечания. В автореферате имеются сокращенные слова и, так как не даны их расшифровки, очень сложно воспринимается текст.

Не понятна концентрация микроспор при анализе таблицы 2 и рисунка 2. Из данных таблицы 2, и в целом из данных автореферата, не ясно, как влияют способ

изоляции и стадии развития микроспор на их концентрацию, и в конечном итоге, на урожайность эмбрионов редиса европейского?

Исследования Козарь Елены Викторовны являются законченным научным трудом.

Считаю, что диссертация Е.В. Козарь «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней и ученых званий....» ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, а ее автор Елена Викторовна Козарь заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Отзыв подготовила:



Бухарова Альмира Рахметовна, доктор сельскохозяйственных наук (научная специальность 06.01.05 – «Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений»), доцент, декан факультета Агро- и биотехнологий ФГБОУ ВО РГАЗУ.

29 ноября 2022 г. А.Р. Бухарова

Подпись заверяю: 
Начальник отдела административной работы

ФГБОУ ВО РГАЗУ

143907, МО г. Балашиха,
ул. Ш. Энтузиастов, дом 50, тел.: 521-24-64

143900, МО г. Балашиха,
ул. Ю. Фучика, дом 1, тел.: 521-24-64

“ ”

20

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны, «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов Редиса европейского (*Raphanus sativus L.*) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов для каждой новой культуры вызывает как научный, так и практический интерес. Успешное и массовое её применение на рапсе, вовсе не гарантирует такой же результат на остальных возделываемых культурах семейства *Brassicaceae*. Более того, даже в рамках одного вида разные сорта (генотипы) показывают огромные отличия. Это хорошо показала диссертант, когда из 42 испытанных генотипов только 4 дали устойчивый отклик. Поэтому изложенная в автореферате технология получения удвоенных гаплоидов полного цикла с подробным изучением всех этапов андрогенеза редиса в условиях *in vitro* весьма актуальна и востребована в современной селекции.

Научная новизна этой работы касается не только какого-либо одного-двух элементов технологии, но и всего процесса андрогенеза у редиса. Эта диссертация просто насыщена примерами новых и нестандартных подходов и научных находок. Именно их совокупность вместе позволила автору достигнуть конечной цели – получить ДН-линии редиса, пригодные для селекционного процесса, преодолеть былую «не отзывчивость» культуры.

Достоверность результатов исследований подтверждается грамотным и глубоким использованием статистического аппарата: дисперсионный анализ фиксирует не только достоверные колебания по факторам, но и доведен до вычисления доли влияния каждого фактора и их взаимодействий, что бывает не в каждой диссертации. Статистические различия между эмпирическими данными автор не стала сводить к одной упрощенной НСР, а применила полное попарное сравнение согласно тесту Дункана.

Также вызывает доброе удивление и одобрение степень обсуждения данной диссертации: 10 научных конференций, 12 публикаций три и которых патенты на селекционные достижения и заявка на патент на изобретение. Редко такое увидишь.

Практическая значимость заключается в новом оригинальном способе выделения микроспор, резко повышающим процент выхода эмбриоидов. Также новаторские способы индукции ризогенеза, предложенные и испытанные автором, надеюсь, помогут многим коллегам, работающим с другими культурами.

Наиболее ценным на мой взгляд является большая теоретическая проработка этапов эмбриогенеза от первых делений в микроспорах до полного органогенеза растений-регенерантов. Редкая диссертационная работа по качеству и глубине проработки проблем, с чем можно поздравить автора.

Таким образом, диссертационная работа Козарь Елены Викторовны, «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов Редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», является законченной научно-исследовательской работой зрелого ученого, имеющая большое теоретическое и практическое значение. Ещё большие перспективы видятся в дальнейшем развитии автором этой технологии. Соискатель стала автором трёх новых ДН-линии редиса, и изобретения на метод изоляции микроспор.

В связи с этим, по объему выполненных исследований, научной и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям ВАК Российской Федерации, а Козарь Елена Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

ПЕРШИН Александр Федорович
кандидат биологических наук, ст.научный сотрудник
Зав. лаборатории биотехнологии
Тел.8 918 086 0863 e-mail: afpershin@mail.ru

ООО «Семеновод»,
353332, Краснодарский край, Крымский р-н,
х. Новоукраинский, Торговая ул, дом № 5, тел 8(861 31) 5-10-05
e-mail: selekcentr@list.ru

Подпись зав. лаборатории биотехнологии ООО «Семеновод»,
кандидата биологических наук Александра Фёдоровича Першина
«ЗАВЕРЯЮ»

Начальник отдела по работе с персоналом

 Кириченко О.В. 01.12.2022



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленный на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Исследования посвящены актуальной теме – разработать технологию получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* для создания исходных гомозиготных линий для селекции сортов и гибридов F₁.

Научная новизна исследований. Впервые изучены все этапы андрогенеза РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* и обнаружены новые паттерны формирования эмбриогенных структур, ранее не описанные в литературе ни для одной из культур – упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента. Для РЕ впервые исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной среды, режим термообработки), проведены наблюдения за поведением этой культуры на всех этапах ИМС технологии и обнаружены биологические особенности на этапе укоренения. Впервые подобраны оптимальные условия для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и дальнейшего органогенеза растений-регенерантов РЕ. Применен нестандартный подход к подбору питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренения микропобегов РЕ. Для семейства Brassicaceae впервые была показана эффективность применения питательной среды МС с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина на этапе индукции эмбриогенеза и жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе укоренения микропобегов РЕ. Найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологии РЕ на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза. Выявлена высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов РЕ. В результате работы разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для РЕ и впервые получены ДН-линии этой культуры.

Теоретические и практические результаты исследований. Полученные новые сведения о паттернах формирования эмбриогенных структур при андрогенезе РЕ расширяют теоретические знания о биологии эмбриогенеза в целом. Предложенный оригинальный способ изоляции микроспор позволяет повысить эффективность ИМС технологии, как для РЕ, так и для других культур семейства Brassicaceae (Kozar et al., 2022). Разработанный принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывает перспективы для разработки новых способов индукции ризогенеза различных культур, как в рамках ДН-технологий, так и в других технологиях, где необходим этап укоренения растений *in vitro* (микрклональное размножение растений, агробактериальная трансформация растений и др.) Применение в селекционных программах разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro* позволяет ускорить создание исходного гомозиготного материала для гибридов F₁ в два-

четыре раза по сравнению с традиционными методами селекции. Полученные ДН-линии РЕ являются ценным материалом для селекции и могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

Существенных замечаний к автореферату диссертации нет.

Работа апробирована на научных конференциях различного уровня. По результатам исследований было опубликовано 12 научных работ в том числе, 2 работы в журналах, входящих в перечень ВАК РФ; 4 работы в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science; 6 работ в сборниках докладов и тезисов. Поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН-линиям РЕ: Жегалов (заявка от 13.07.22 г. № 86648/7754534), Вена (заявка от 13.07.22 г. № 86649/7754535), Персей (заявка от 13.07.22 г. № 86647/7754533) и заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae» (заявка от 25.05.2022 г. № 2022114090/10(029482)).

Представленная к защите диссертационная работа Козарь Елены Викторовны «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая по своей актуальности, объему экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости отвечает требованиям п. 9-11, 13, 14 «Положение о присуждении ученых степеней» ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Козарь Елена Викторовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Отзыв подготовили:

Доктор сельскохозяйственных наук, (06.01.06 – Овощеводство), доцент,

главный научный сотрудник



Федоров Александр Владимирович

Кандидат биологических наук, (03.02.08 – Экология (биология)),

старший научный сотрудник



Зорин Денис Александрович

Отдел интродукции и акклиматизации растений ФГБУН Удмуртский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук
426067, Россия, г. Ижевск, ул. Т. Барамзиной, 34, тел.: +7 (3412) 508200, моб.: +79128763319, e-mail: udmgarden@mail.ru

Сайт: <http://www.udman.ru>

Подписи Федорова А.В.,
Зорина Д.А. заверяю
Первый заместитель директора
УдмФИЦ УрО РАН



Семенихин А.Б.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Разработка и внедрение клеточных технологий существенно изменили селекционный процесс растений в мире. Культура микроспор *in vitro* (андрогенез) занимает ведущее место в селекционных программах по ускорению процесса создания генетического разнообразия растений. В крупнейших иностранных (Syngenta, Bayer и др.) и отечественных (Гавриш, Поиск и др.) селекционных компаниях получение удвоенных гаплоидов поставлено на конвейерную основу. Гомозиготное состояние генов полученных регенератов также делает ДН-растения незаменимыми в генетических исследованиях наследования признаков (особенно рецессивных). Для отдельных видов семейства *Brassicaceae* Vorn. уже разработаны протоколы получения ДН-растений в культуре микроспор *in vitro*, тем не менее, универсальной эффективной методики не существует, а для ряда культур она все еще не разработана. Сложность разработки эффективной технологии получения удвоенных гаплоидов состоит в большом числе факторов, степень влияния каждого из которых для разных культур может существенно отличаться. При этом существуют не только межвидовые, но и внутривидовые (генотип-зависимые) различия в отзывчивости на андрогенез и гиногенез.

Редис европейский, относящийся к виду *Raphanus sativus* L., является сложной и неотзывчивой к ДН-технологии культурой в этом семействе, так как отсутствие полноценных фундаментальных исследований андрогенеза и регенерации в условиях *in vitro* не позволяло выявить основные причины и пути преодоления низкой отзывчивости и успешно завершить полный цикл получения ДН-растений. Поэтому основными задачами данной работы стало целенаправленное изучение этих сложных биологических процессов у редиса европейского, что позволило сместить вектор исследований от спорадических в сторону аналитических, использовать системный подбор и анализ влияния на эмбриогенез и регенерацию разных факторов воздействия и, в итоге, разработать первый протокол получения селекционно ценных ДН-растений этой овощной культуры.

В ходе исследований были изучены особенности развития эмбриоидов и растений-регенерантов редиса, определены критические факторы, влияющие на эффективность эмбриогенеза в культуре микроспор (размер бутона, структура

популяции микроспор, способ изоляции микроспор, состав питательной среды, режим термообработки и др.), индукцию ризогенеза и регенерацию микропобегов *in vitro*. Большой интерес представляют данные сравнительного анализа развития эмбриоидов с развитием зиготического зародыша и выявленные отличия в паттернах формирования эмбриогенных структур редиса от других видов сем. *Brassicaceae* при прямом пути развития эмбриоидов и развитии с образованием суспензоров. Это – упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента.

Выявлено, что на этапе регенерации прямого прорастания эмбриоидов не происходит и для индукции вторичного эмбриогенеза и побегообразования в питательные среды следует добавлять БАП и ГК. Обнаружены биологические особенности редиса европейского на этапе индукции корнеобразования в условиях *in vitro* – высокая склонность микропобегов к образованию корнеплодоподобных структур (опухолеобразование) в области гипокотилия и отсутствие стимулирующего эффекта ауксинов на ризогенез при добавлении в твердую питательную среду, что препятствует формированию нормальной корневой системы и может приводить к полной потере растений. Автором предложен оригинальный методический подход повышения эффективности ризогенеза микропобегов редиса европейского, основанный на технике посадки микропобегов на агаризованную среду для регенерации, применения последовательных пересадок микропобегов с иссечением корнеплодоподобных структур до образования нормальной корневой системы, что в совокупности позволило повысить процент успешно укоренившихся растений в условиях *in vivo* до 95–98%. Важным результатом исследований также является еще одна биологическая особенность редиса – это высокая склонность растений-регенерантов редиса европейского к спонтанному удвоению набора хромосом, что позволяет исключить необходимость в дополнительном проведении трудоемкого этапа обработки токсичными антимитотическими агентами.

Представленная диссертационная работа имеет значимый практический выход – разработан протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые в мире получены ДН-линии этой культуры, на которые поданы заявки на патенты. Они могут представлять интерес не только для включения в селекционные программы, но и для генетических исследований по наследованию селекционно-ценных признаков для создания картирующих популяций и для проведения полногеномного секвенирования.

В качестве пожелания следует отметить необходимость продолжения углубленных исследований в данном направлении и изучения механизмов

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны по теме «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus Sativus* L) в культуре изолированных микроспор In Vitro», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

До настоящего времени не было сведений об успешном завершении полного цикла получения удвоенных гаплоидов редиса европейского и отсутствовали фундаментальные исследования по изучению этапов андрогенеза в условиях in vitro, позволяющие определить основные причины и пути преодоления его низкой отзывчивости. Поэтому изучение андрогенеза и разработка ИМС технологии для РЕ актуальная тема для исследований.

Достоверность результатов заключается в использовании актуальных подходов к проведению научных исследований с соблюдением общепринятых методик научных опытов с применением современных методов анализа и расчетов. Рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы аргументированы, соответствуют ее содержанию и являются итогом проведенных лично автором обширного объема комплексных исследований.

Автором опубликовано 12 научных работ, из них 2 в журналах, рекомендованных в ВАК РФ, 4 – в журналах индексируемых в базах Scopus Web of science.

Данная работа является самостоятельным, завершенным, апробированным научным исследованием.

Считаю, что диссертация Козарь Елены Викторовны соответствует требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Браилова Ирина Сергеевна

кандидат сельскохозяйственных наук (06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений, 2018 г.)

Заведующая отделом генетики и иммунитета
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Воронежский федеральный аграрный научный центр им. В.В. Докучаева» (ФГБНУ «Воронежский ФАНЦ им. В.В. Докучаева»

Воронежская область, Таловский район, пос 2 участка
Института им Докучаева, квартал 5, дом 81

Тел: 8(47352) 4-55-37, факс: 8(47352) 4-55-37

E-mail: niish1c@mail.ru

Подпись Браиловой И.С. заверяю

Зав отдела кадров ФГБНУ

«Воронежский ФАНЦ им. В.В. Докучаева»

1.12.2022



Баллонова Н.С.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации *Козарь Елены Викторовны* по теме:
«Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского
(*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*»,
на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности
4.1.2. - селекция, семеноводство и биотехнология растений

В традиционной селекции чистые линии получают путем самоопыления (инбридинг, инцухт) в течение нескольких поколений, с постоянным отбором растений по селекционно важным признакам. Однако этот способ требует колоссальных временных затрат (у некоторых видов растений до 12 лет) и даже при многократном инбридинге почти невозможно получить полностью гомозиготные растения по всем генам. Кроме того, при самоопылении возникает ряд проблем – это самонесовместимость и «инбредная депрессия», в результате чего происходит потеря ценного селекционного материала. Ввиду этого ученые нашли другой способ получения гомозиготных растений, в результате чего сформировалась целое направление – биотехнологические методы, которые работают на клеточном уровне.

Ведущее место в селекционных программах по ускорению создания гибридов F₁ в настоящее время начинает занимать метод получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro*. Технологии, позволяющие получить полноценное растение из одной половой клетки, включают в себя несколько этапов, на каждом из которых необходимо учесть огромное количество факторов. Поскольку это достаточно молодое направление исследований, биология и всё разнообразие возможных процессов пока не до конца изучены, поэтому эти технологии не универсальны. Для каждого вида, а иногда подвида и даже сорта растений, требуется подбор индивидуальных условий, разработка или модификация каждого этапа. Особенно это актуально для неотзывчивых к андрогенезу овощных культур, к которым относится редис европейский из семейства *Brassicaceae*, поэтому своевременность и актуальность темы диссертации не вызывает сомнения.

В результате проведения большого объема методически выстроенных исследований автором получены новые теоретические знания об особенностях прохождения разных этапов андрогенеза редиса европейского в условиях *in vitro*, позволившие выявить основные причины и найти пути преодоления его низкой отзывчивости к эмбриогенезу; разработан принципиально новый подход индукции ризогенеза *in vitro* и повышения эффективности корнеобразования на этапе укоренения растений *in vitro*; выявлена высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов; успешно завершён полный цикл и разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов и созданы гомозиготные линии редиса разных сортоформ, которые уже включены в селекционную работу, что является ценным практическим выходом данной работы (поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН- линиям редиса европейского).

Следует отметить высокую публикационную активность автора в рейтинговых отечественных и зарубежных журналах; активное участие и апробация полученных данных на различных международных научных форумах. Достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов в заключении подтверждены соответствующей статистической обработкой и не вызывают сомнений.

Диссертационная работа Козарь Елены Викторовны на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней»), а автор несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени, кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

«28» ноября 2022 года

Доктор сельскохозяйственных наук, декан
агрономического факультета,
заведующий кафедрой агрохимии, почвоведения и
агроэкологии

Н. М. Троц

Кандидат биологических наук,
доцент кафедры ФМиИТ

Т.С. Нижарадзе

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный аграрный университет» 446442, Самарская область, г. Кинель, п.г.т. Усть-Кинельский, ул. Учебная, 2.

Троц Наталья Михайловна, тел. +7 (939) 754 04 86, E-mail: troz_shi@mail.ru

Нижарадзе Татьяна Сергеевна, тел. +7(987)4313533, E-mail: tanyanizh@rambler.ru



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Е. В.

«Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Представленная работа посвящена актуальной теме – разработке технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* с целью создания исходных гомозиготных линий в селекции сортов и гибридов F1.

Результаты исследований соискателя имеют существенную научную новизну – впервые изучены все этапы андрогенеза РЕ в культуре изолированных микроспор *in vitro*, исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу, проведены наблюдения за поведением этой культуры на всех этапах ИМС технологии, подобраны оптимальные условия для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и последующих этапов органогенеза растений-регенерантов РЕ. Также применен нестандартный подход к подбору питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренения микропобегов РЕ.

Практическая значимость работы состоит в разработке оригинального способа изоляции микроспор редиса европейского и других культур семейства Капустные, способствующего повышению эффективности ИМС технологии, разработан протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского, впервые в мире получены ДН-линии этой культуры.

Актуальность избранной диссертационной темы исследований не вызывает сомнений. Новизна и направленная практическая значимость исследований – достаточно весомы.

Материал работы апробирован на международных, региональных конференциях и опубликован в 12 печатных работах.

Экспериментальный материал обработан с использованием методов математической статистики. Достоверность полученных данных и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнения.

В целом, завершенная научно-исследовательская работа Козарь Елены Викторовны «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» соответствует требованиям, установленным п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Доктор сельскохозяйственных наук,
доцент, заведующий кафедрой растениеводства,
земледелия и селекции ФГБОУ ВО Удмуртский ГАУ
28.11.2022 г.


Э. Ф. Вафина

Кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры
плодоовощеводства и защиты растений
ФГБОУ ВО Удмуртский ГАУ
28.11.2022 г.


Л. А. Несмелова

Вафина Эльмира Фатхулловна
Несмелова Любовь Александровна
ФГБОУ ВО Удмуртский ГАУ
426069 Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Студенческая, 11
e-mail: vaf-ef@mail.ru, lubownecmelowa@yandex.ru
Контактный телефон: 8(3412)773731

Подписи Вафиной Э.Ф., Несмеловой Л.А. удостоверяю:
Начальник управления кадрового делопроизводства


Лучихина Ирина Фаридовна

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны по теме:
«Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского
(*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*»,
на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 4.1.2. - селекция, семеноводство и биотехнология растений

В повышении эффективности овощеводства важная роль отводится селекции, на которую возложена задача создания новых конкурентоспособных гибридов F₁, особенно в связи с тем, что доля импортных семян овощных культур в России составляет около 80%. Это является острой проблемой с точки зрения экономических затрат на производство продовольствия в РФ, а также подвергает продовольственную безопасность государства потенциальным политическим рискам. В том числе, ни для кого не секрет, что сейчас быстро меняется климат и остро стоит вопрос резкого ускорения селекционного процесса, чтобы «успевать» создавать гибриды F₁, адаптированные к новым условиям среды. Разработка и внедрение клеточных технологий существенно изменили селекционный процесс в мире и позволяют существенно ускорить создание новых гибридов F₁ сельскохозяйственных растений за счет сокращения наиболее длительного предбридингового этапа - создания родительских «чистых» линий. Особенно актуально это для перекрестноопыляемых культур, где создание выровненных родительских форм занимает 6-12 лет. На данный момент для некоторых овощных культур уже разработаны эффективные технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре микроспор *in vitro*, но для редиса европейского (род *Raphanus sativus*), ИМС технологии пока не было опубликовано, разработка которой и стало целью данных исследований.

В результате проведения большого объема исследований автору удалось не только разработать такую технологию, получить новые оригинальные данные по особенностям процессов эмбриогенеза и укоренения растений-регенерантов, но и впервые получить гомозиготные ДН-растения редиса европейского, как основы создания биоразнообразия чистых линий для новых отечественных гибридов F₁. Три гомозиготные линии, на которые поданы заявки на патент, могут в дальнейшем использоваться как модельные растения для повышения эффективности разработанной технологии получения ДН-растений. Кроме того, удвоенные гаплоиды являются превосходным материалом не только для селекционеров, но и для генетических исследований этой культуры. Особый интерес гомозиготные линии представляют для изучения аномального деления клеток (дифференцировка и пролиферация клеток), ввиду уникальной биологической особенности растений редиса – склонности к спонтанному опухолеобразованию.

Использование ДН-растений в качестве модельного объекта может пополнить фундаментальные знания о биологии клеточных процессов в целом, в том числе и при образовании раковых опухолей, что является проблемой мирового масштаба.

Особо следует отметить полноту и глубину проведенного анализа полученных данных, качественно выполненные оригинальные фотографии развития эмбрионных структур, диаграммы, схемы технологического процесса, интересные обсуждения и обоснованные выводы, представленные в автореферате. Это свидетельствуют о высокой квалификационной подготовке диссертанта, как самостоятельного ученого. Существенных замечаний по сути работы нет, а мелкие опечатки и неточности не снижают ценность данной работы. Таким образом, диссертационная работа Козарь Елены Викторовны на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» является вполне законченным научным трудом и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней»), а автор несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

« 02 » декабря 2022 года

Доктор сельскохозяйственных наук _____

(Малько А. М.)

Подпись Малько А. М. заверяю _____
и трудовых отношений Карпова Г. В.

начальник отдела кадров

Сведения о рецензентах:

Малько Александр Михайлович
Доктор сельскохозяйственных наук
ФГБУ «Россельхозцентр»
Директор
Телефон – 8(495) 661-09-91*202
E-mail: rsckartofel@mail.ru

Отзыв

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны на тему «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», подготовленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Получение удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* - это технология, способная существенно ускорить получение генетически однородных линий, причем в неограниченно больших количествах, а, следовательно, и создание F₁ гибридов. Эта технология уже успешно реализована в селекции многих сельскохозяйственных растений и заслуживает еще более широкого распространения на другие культуры, что определяет ее актуальность.

Из материалов, представленных в автореферате, видно, что автором проделана значительная работа по созданию полного цикла получения удвоенных гаплоидов редиса, завершившаяся получением репродукции гомозиготных линий, пригодных для создания F₁ гибридов, что является существенным вкладом в развитие селекционной науки.

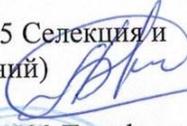
Работа содержит элементы новизны, в том числе расширяющие теоретические знания о биологии эмбриогенеза. Подана заявка на изобретение модифицированного метода изоляции микроспор в культуре микроспор (№ 2022114090/10(029482) от 25.05.2022), которая позволяет повысить выход эмбриоидов в среднем в 3 раза по сравнению со стандартным способом изоляции.

О практической значимости свидетельствует создание трех ДН-линии редиса с комплексом селекционно ценных признаков, которые можно использовать для селекции F₁ гибридов и для генетических исследований.

Результаты исследований Елены Викторовны широко опубликованы в открытой печати (в 12 печатных работах, 2 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 4 в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science) и доложены на региональных и международных конференциях.

Учитывая большой объем экспериментального материала, глубокий характер исследований, значимость сделанных выводов, считаю, что научный уровень работы «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Козарь Елена Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Главный научный сотрудник группы семеноведения центра селекции и семеноводства Всероссийского научно-исследовательского института овощеводства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр овощеводства» (ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО)

Доктор сельскохозяйственных наук (06.01.05 Селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений)  Бухаров Александр Федорович

140153, МО, Раменский район, д. Верея, стр. 500 Телефон: +7(496)462-43-64

Подписи А.Ф. Бухарова удостоверяю
Начальник отдела кадров ВНИИО – филиал ФГБНУ ФНЦО

 А.А. Тарновская

24.11.2022 г.



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны по теме: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. - селекция, семеноводство и биотехнология растений

Актуальность разработки отечественной технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* продиктована реалиями современных направлений развития биологической науки с целью совершенствования и ускорения селекционного процесса. В процессе исследований были получены новые фундаментальные знания о процессе перехода микроспор на соматический путь развития (эмбриогенез), образования эмбриоидов - зародышей будущих растений-регенерантов; выявлены причины плохой отзывчивости редиса европейского к ИМС технологии и предложены модификации элементов технологии для их преодоления.

К важным достижениям можно отнести разработку нестандартных подходов для решения ряда узких моментов, ранее не описанных в литературе, без которых было бы невозможным завершение полного цикла получения гомозиготных растений. Одно из таких решений было применено на этапе ризогенеза эмбриоидов и растений-регенерантов, где наблюдались наибольшие потери ценного материала из-за формирования спонтанных опухолей, препятствующих образованию корней. Автором предложен и апробирован новаторский способ укоренения растений без «заглубления» в питательную среду соответствующего состава, где в большинстве случаев спонтанного опухолеобразования не происходит и формируется нормальная корневая система. Также выявлена высокая склонность растений-регенерантов редиса европейского в процессе развития к спонтанному удвоению хромосом, и жаль, что детальному изучению механизмов этого явления автор не смог уделить должного внимания. В результате это позволило впервые в мире завершить полный цикл получения гомозиготных удвоенных гаплоидов (DH-линии) растений редиса европейского, что имеет значимую практическую ценность для создания новых отечественных гибридов. Получаемые с использованием разработанного протокола эмбриоиды, регенеранты и DH-растения также представляют интерес для физиологов, генетиков и молекулярных биологов, особенно при изучении роли гормональной регуляции разных процессов, наследования признаков, картирования генома, характера взаимодействия генов и т.д.

Результаты диссертации и сделанные по ним выводы логичны, достоверны и обоснованы. Они подробно доложены на авторитетных конференциях международного и всерос-

сийского уровня. Теоретические обоснования и описание модификаций разработанной технологии освещены в опубликованных статьях и протоколах, в том числе и в престижных отечественных и зарубежных изданиях, то есть успешно прошли апробацию в научном обществе.

Таким образом, диссертационная работа Козарь Елены Викторовны на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении учёных степеней»), а автор несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Замечаний по автореферату нет.

«29» ноября 2022 года

Кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
лаборатории Нанобиотехнологии,

Волошин Александр Григорьевич

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации

Почтовый адрес:

142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, 24, территория «Квартал А», Россия

Тел. 8(4967) 36-07-73 факс 8(4967) 36-00-10

voloshinag@mail.ru

Подпись Волошина А.Г. удостоверяю.

Ученый секретарь

Доктор биологических наук



Коломбет Л.В

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны на тему:
«РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ РЕДИСА ЕВРОПЕЙСКОГО (*RAPHANUS SATIVUS* L.) В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРОСПОР *IN VITRO*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

В России доля импортных семян овощных культур составляет около 80%, поэтому на селекцию возложена задача повышения эффективности овощеводства путем создания новых отечественных сортов и гибридов F1. Районированный сортимент по состоянию на 2022 год включает 50 сортов и гибридов редиса, из которых основная доля представлена гибридами иностранной селекции (70%). Принимая во внимание скороспелость данной культуры и ценный химический состав, создание раннеспелых сортов и гибридов этой овощной культуры позволяет получать несколько урожаев в год, особенно на юге России.

Технология получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* занимает ведущее место в селекционных программах по ускорению создания гибридов F1. Для ряда сельскохозяйственных культур получение удвоенных гаплоидов поставлено на конвейерную основу. Тем не менее универсальных ИМС протоколов не существует и многие овощные культуры остаются неотзывчивыми к андрогенезу. Редис европейский – одна из таких культур в семействе *Brassicaceae*. До настоящего времени не было сведений об успешном завершении полного цикла получения удвоенных гаплоидов редиса и отсутствовали фундаментальные исследования по изучению этапов андрогенеза в условиях *in vitro*, позволяющие определить основные причины и пути преодоления его низкой отзывчивости. Поэтому изучение андрогенеза и разработка ИМС технологии для этой важной овощной культуры актуальная тема для исследований.

Цель исследований автора заключалась разработать технологию получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* для создания исходных гомозиготных линий для селекции сортов и гибридов F1.

Автором найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологии редиса на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза. Выявлена высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов этой культуры. В результате работы разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые получены ДН-линии этой культуры. Автором впервые с использованием принципиально нового исходного материала, полученного методом культуры изолированных микроспор *in vitro*, показана возможность создания гибридов F1 нового поколения за короткий период времени. Представлено разнообразие морфологических признаков у ДН-линий исходного материала для селекции.

Предложенный диссертантом оригинальный способ изоляции микроспор позволяет повысить эффективность ИМС технологии для разных видов культур семейства *Brassicaceae*. Разработанный принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывает перспективы для разработки новых способов индукции ризогенеза различных культур, как в рамках ДН-технологий, так и в других технологиях, где необходим этап укоренения растений *in vitro*.

Применение в селекционных программах разработанной технологии получения удвоенных гаплоидов у перекрестно опыляемых культур сем. *Brassicaceae* в культуре изолированных микроспор *in vitro* позволяет ускорить создание исходного гомозиготного материала для гибридов F1 в два-четыре раза по сравнению с традиционными методами селекции. Полученные ДН-линии редиса европейского являются ценным материалом для селекции и могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

Автором по материалу диссертации опубликовано 12 научных работ: 2 работы в журналах, входящих в перечень ВАК РФ; 4 работы в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science; 6 работ в сборниках докладов и тезисов, поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН-линиям РЕ. Результаты работы сообщены на 10 Международных научных конференциях и школе молодых ученых.

Диссертационная работа Козарь Елены Викторовны на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в

культуре изолированных микроспор in vitro», соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»), а автор несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени, кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

старший научный сотрудник
группы частной генетики и генетических ресурсов
овощных культур Дагестанской опытной станции
– филиала Федерального бюджетного государственного
научного учреждения «Федеральный
исследовательский центр Всероссийский
институт генетических ресурсов растений
им. Н.И. Вавилова», кандидат сельскохозяйственных
наук, по специальности – 06.01.05
– селекция и семеноводство

Гаджимустапаева Евгения Гусейновна
тел. 8 (960) 420 17 11;

E-mail: vir-evg-gajimus@yandex.ru

Ученый секретарь Дагестанской опытной
станции – филиала Федерального бюджетного
государственного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений им. Н.И. Вавилова», доктор
биологических наук, по специальности
– 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

Баташева Белахан Абдурашидовна

тел. 8 (928) 591 17 85

E-mail: kostek-kum@rambler.ru

Дата: 21.11.2022 г.

Почтовый адрес: 368312, Республика Дагестан,
Дербентский район, с. Вавилово

Подписи Е.Г. Гаджимустапаевой, Б.А. Баташевой заверяю

инспектор отдела кадров Б.Р. Ибишева.



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Козарь Елены Викторовны «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus L.*) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Редис европейский является двулетней культурой, слабоотзывчивой к андрогенезу, а отсутствие фундаментальных исследований по изучению этапов андрогенеза у данной культуры свидетельствует о том, что разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus L.*) в культуре изолированных микроспор *in vitro* является актуальной и востребованной задачей на сегодняшний день.

Автором показаны особенности биологического развития редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, ранее не отмеченных у других культур семейства *Brassicaceae*; разработаны новые методические подходы и подобраны критические факторы на различных этапах получения удвоенных гаплоидов у данной культуры; выявлена высокая склонность растений-регенерантов редиса европейского к спонтанному удвоению набора хромосом.

Разработан протокол получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, впервые в мире получены три ДН-линии, обладающие ценными селекционными признаками.

Основные положения диссертационной работы были апробированы на международных, всероссийских и региональных научно-практических конференциях в период с 2018 по 2022 годы. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 2 работы в журналах, входящих в перечень ВАК РФ; 4 работы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of science, 6 работ в сборниках докладов и тезисов, а также поданы 3 заявки на патенты.

Исследования, представленные автором, имеют несомненную новизну. Поставленные цели и задачи выполнены в полном объеме, что позволило автору получить новые ценные теоретические и практические результаты, дать обоснованное заключение и рекомендации по практическому применению результатов диссертационной работы, а также указать перспективы дальнейшей разработки темы исследования.

Считаю, что диссертационная работа Козарь Елены Викторовны, является завершенной научно-квалифицированной работой, в полной мере соответствует требованиям ВАК РФ, предъявленным к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Кандидат биологических наук,
зам. директора по молекулярной
диагностике и биотехнологии
ООО «НИИСОК»



М.В. Будылин

22 ноября 2022 г.

Будылин Михаил Вячеславович
Кандидат биологических наук
Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский
институт селекции овощных культур»
Зам. директора по молекулярной диагностике и биотехнологии
127015, г. Москва, ул. Новодмитровская, д. 2, корп. 2.
Тел.: 8(903)149-95-86
budylinmw@gmail.com

Подпись М.В. Будылина заверяю
ученый секретарь ООО «НИИССО»



Т.Л. Леонова

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Козарь Елены Викторовны** «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2 – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Для поддержания здорового образа жизни значительную часть в рационе человека занимают овощные культуры. Одной из таких культур является редис (*Raphanus sativus* L.) – представитель семейства Капустные (*Brassicaceae*). Редис содержит полезные для работы сердца флавоноиды – фитокомпоненты, снижающие риск кардиологических нарушений. Помимо богатства аскорбиновой (витамином С), фолиевой кислотой и калием, редис также является источником витамина В₆, рибофлавина, магния и кальция. Мировое производство редиса (7 миллионов тонн в год) составляет около 2% от всего производства овощей. В настоящее время на селекцию овощных культур возложена задача повышения эффективности и рентабельности овощеводства путем создания новых отечественных сортов и гибридов F₁. Ведущее место в селекционных программах по ускорению создания гибридов F₁ для ряда сельскохозяйственных культур занимает технология получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro*. Осложняется все тем, что многие овощные культуры (в том числе и редис европейский) остаются неотзывчивыми к андрогенезу. Весьма актуальной и инновационной является задача разработать технологию получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* для создания исходных гомозиготных линий для селекции сортов и гибридов F₁.

В результате проведенных исследований автором впервые на высоком методическом уровне впервые изучены все этапы андрогенеза редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* и обнаружены новые паттерны формирования эмбриогенных структур, ранее не описанные в литературе ни для одной из культур – упорядоченные деления в микроспорах с интактными экзинами, прикрепление суспензоров к апикальным частям эмбриоидов и формирование апикально-базальной оси эмбриоида вдоль оси суспензорных нитей при формировании эмбриоида в середине филамента. Для редиса европейского впервые исследованы факторы, влияющие на его отзывчивость к эмбриогенезу (размер бутона, структура популяции микроспор, изоляция микроспор, состав питательной

среды, режим термообработки), проведены наблюдения за поведением этой культуры на всех этапах (isolated microspore culture – ИМС) технологии и обнаружены биологические особенности на этапе укоренения. Впервые подобраны оптимальные условия для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и дальнейшего органогенеза растений-регенерантов РЕ. Применен нестандартный подход к подбору питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренения микропобегов редиса европейского. Для семейства *Brassicaceae* впервые была показана эффективность применения питательной среды МС с 13% сахарозой и 500 мг/л гидролизата казеина на этапе индукции эмбриогенеза и жидкой питательной среды МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина на этапе укоренения микропобегов редиса европейского. Найдены оригинальные методические решения для повышения эффективности ИМС технологии редиса европейского на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза. Выявлена высокая частота спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов редиса европейского. Автором разработан первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые получены ДН-линии этой культуры.

В работе представлены таблицы и рисунки, наглядно демонстрирующие результаты проведенных исследований. Достоверность выводов подтверждена статистической обработкой данных. Грамотно и последовательно изложены основные положения диссертационной работы. По результатам исследований опубликовано 12 научных работ, из них: 2 работы в реферируемых изданиях, входящих в перечень ВАК РФ; 4 работы в журналах индексируемых в базах Scopus и Web of science; 6 работ в сборниках докладов и тезисов; в том числе поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН - линиям РЕ: Жегалов (заявка от 13.07.22 г. № 86648/7754534), Веня (заявка от 13.07.22 г. № 86649/7754535), Персей (заявка от 13.07.22 г. № 86647/7754533) и заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микро- спор в культуре микроспор *in vitro* для семейства *Brassicaceae*» (заявка от 25.05.2022 г. № 2022114090/10(029482)).

Считаю, что диссертационная работа Елены Викторовны Козарь на тему: «Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*» соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней»), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата

биологических наук по специальности 4.1.2 – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

08.12.2022 г.

Стрельников Евгений Александрович

кандидат биологических наук по специальности 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией селекции гибридов рапса отдела селекции рапса и горчицы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта».

350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д.17

тел.: (861) 255-59-33; e-mail: [vniimk\(@vniimk.ru](mailto:vniimk(@vniimk.ru)

Подпись Стрельникова Е.А. заверяю

Ученый секретарь

ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК

Кандидат биологических наук



М.В. Захарова