

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу 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.

Актуальность темы. Диссертационная работа Козарь Е.В. посвящена разработке технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro*. Удвоенные гаплоиды уже около 100 лет широко используются во всем мире в селекционных программах и фундаментальных исследованиях как ценный гомозиготный материал. Такие технологии позволяют существенно ускорить селекционный процесс создания сортов и гибридов F₁, за счет ускорения наиболее трудоемкого и продолжительного этапа в селекционном процессе – создания чистых линий. Кроме того, поскольку у удвоенных гаплоидов все гены находятся в гомозиготном состоянии, все рецессивные признаки у таких растений хорошо видны, так как они не маскируются под действием доминантных аллелей и селекционеру удобно проводить отбор желаемых генотипов, фиксировать мутации и проводить скрининг уже в первом поколении. Наличие ДН-линий в большом количестве повышает эффективность селекционных программ, в связи, с чем очень желательны надежные и эффективные технологии. На данный момент протоколы производства удвоенных гаплоидов описаны для 384 видов, а в крупнейших иностранных селекционных кампаниях производство удвоенных гаплоидов поставлено на конвейерную основу. Однако не все культуры отзывчивы к этим технологиям и в настоящее время разработкой таких технологий для новых культур занимаются ученые по всему миру.

Культура изолированных микроспор *in vitro* является одной из самых перспективных, так как в препаратах отсутствуют соматические клетки, ввиду чего можно с уверенностью утверждать, что все растения, полученные с помощью этой технологии, имеют гаплоидное происхождение, и отсутствует необходимость в дополнительном трудоемком этапе по проверке растений с помощью молекулярных маркеров.

Редис европейский – одна из самых не отзывчивых культур в семействе Brassicaceae. До настоящего времени в открытом доступе не было информации об успешном получении удвоенных гаплоидов редиса европейского, соответственно, отсутствовали и фундаментальные

исследования по изучению этапов андрогенеза этой культуры в условиях *in vitro*. Поэтому исследования в этом направлении имеют большое научное и практическое значение, новизну и актуальность.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертационная работа Козарь Е.В. включает материалы теоретических и лабораторных исследований.

Автор корректно использует известные научные методы для обоснования полученных результатов, выводов и рекомендаций. Диссертантом изучена и проанализирована отечественная и зарубежная литература, на основе чего диссертант подробно обсуждает опыт своих исследований и сравнивает полученные результаты с результатами других исследователей. Выводы и результаты, полученные диссертантом обоснованы и достоверны, так как опираются на результаты статистического анализа данных.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций.

Результаты проведенных исследований, безусловно, обладают научной новизной. Работа посвящена культуре редиса европейского, которая ранее была не отзывчива к ДН-технологиям и данные обо всех элементах технологии, сопряженных с получением удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* являются абсолютно новыми.

В результате проведенных исследований Козарь Е.В. удалось разработать первый протокол получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и впервые получить ДН-линии этой культуры. Помимо этого, в процессе работы был подробно изучены факторы индукции андрогенеза и описаны особенности эмбриогенеза редиса европейского, что расширяет фундаментальные знания об этом процессе в целом.

Соответствие диссертации и автореферата требованиям положения о порядке присуждения научным и научно-педагогическим работникам ученых степеней и присвоения научным работникам ученых званий. Диссертация Козарь Е.В. является завершенной научно-исследовательской работой. Автореферат и диссертация оформлены в соответствие с требованиями ВАК РФ, предъявляемыми к диссертациям п.п. 9 - 14 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842. Автореферат отражает основное содержание диссертационной работы. Соискателем был выполнен значительный объем экспериментальных

исследований, которые подробно изложены в диссертации. О достоверности полученных результатов свидетельствуют данные, представленные на рисунках, в таблицах и приложениях со статистической обработкой данных. Выводы и выносимые на защиту положения лаконичны, основаны на полученных результатах и соответствуют цели и задачам исследований.

Основные положения диссертационной работы доложены на 10 международных конференциях. Результаты диссертационной работы представлены в опубликованных 12 научных работах, из них: 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; в том числе поданы 3 заявки на патенты на селекционные достижения по ДН-линиям РЕ и заявка на патент на изобретение «Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae».

Оценка содержания диссертации. Диссертационная работа имеет классическую структуру: изложена на 128 страницах, состоит из введения, основной части и заключения и включает 7 таблиц, 34 рисунка и 7 приложений. Библиографический список включает 167 источников, в том числе 154 на иностранном языке.

Первая глава носит обзорный характер, в которой автор подробно описывает культуру редиса европейского, описывает состояние разработок технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для культур семейства Brassicaceae, описывает проблемы, связанные с получением удвоенных гаплоидов рода *Raphanus*, а также факторы, влияющие на эффективность технологии получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* и варианты повышения эффективности данной технологии за счет различных методических подходов.

Во второй главе отражены материалы и методы исследования. Третья глава посвящена результатам исследований, на основании которых делаются соответствующие выводы.

В диссертационной работе изучаются эмбриогенез редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro*, различные факторы, оказывающие на него влияние, а также дальнейшие этапы регенерации и ризогенеза растений в условиях *in vitro* и укоренения *in vivo*, что находит отражение в первом и втором выводе заключения. Третий вывод раскрывает способность растений редиса европейского к спонтанному удвоению хромосомного набора и отсутствию необходимости в дополнительном трудоемком этапе – обработке антимиотическими агентами. Четвертый вывод отражает полученный практический результат проведенных

исследований - отобранные из ДН-потомства по селекционно-ценным признакам три ДН-линии (проходят этап регистрации патентов на селекционные достижения) уже включены в селекционный процесс.

Закключение и практические рекомендации вытекают из теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертации, и представляют практический интерес. Диссертационная работа представляет собой единую научную работу, логично и последовательно изложенную и представленную к защите в виде завершеного труда.

Замечания и пожелания по диссертационной работе

1. Целесообразно давать название подглав более емко.
2. Желательно вынести в отдельную задачу исследований – изучение качественного состава микроспор в бутонах различного размера, так как этот вопрос очень хорошо обсуждается в литературном обзоре (глава 1), показана важность данной процедуры, а в главе 3 приводятся результаты исследований в этом направлении.
3. Следовало бы уточнить, чем раздел 1.6.4 «Питательная среда для индукции эмбриогенеза» отличается от раздела 1.6.5 «Питательная среда для регенерации». Целесообразно эти два раздела объединить в один.
4. Не совсем верно высказывание соискателя – «Холодовая обработка бутонов для капустных культур при культивировании микроспор позволяет планировать рабочее время и дает возможность увеличить количество бутонов оптимального размера, собирая их с растения в течение нескольких дней.» (стр. 35). С одной стороны, это верно, но, как правило, холоддовая обработка может быть неотъемлемой частью технологического процесса получения гаплоидных растений. Именно в этот момент происходит переключение программы развития микроспор с гаметофитного, на спорофитный путь развития.
5. В разделе 2.5.1 «Влияние качественного состава популяции изолированных микроспор на выход эмбриоидов» приводится повторение методики, изложенной в разделе 2.5 «Культура изолированных микроспор *in vitro*»
6. Название таблицы 3 (стр. 52) не очень корректно. Что автор понимал под словосочетанием «Урожайность эмбриоидов». Кроме того, в этой таблице в четвертом столбике приведены средние значения количества эмбриоидов при одном размере бутона, но при разных способах изоляции микроспор. Нельзя приводить средние значения, так как идет сравнение именно количества эмбриоидов по вариантам. В каких единицах измеряется «урожайность эмбриоидов»?

7. Соискатель не верно называет первую стадию эмбриогенеза. Согласно определению Стеварда (1957 год) первую стадию следует называть - стадия глобулы, а не шаровидная стадия.

8. Является ли термин «иссечение» общепринятым при описании экспериментов с растениями?

9. В списке использованной литературы под № 5, 8, 12, 16, 21, 26, 42, 56, 93, 105, 108, 127, 138 не приведены номера страниц или количество страниц.

Заключение. Диссертационная работа Козарь Елены Викторовны представляет собой законченную научно-квалификационную работу, содержащую теоретические и методологические положения. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют значение для российской науки и практики. Диссертационная работа отвечает требованиям установленных п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24.09.2013 №842), а ее автор Козарь Елена Викторовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Калашникова Елена Анатольевна,
доктор биологических наук (03.00.23 – Биотехнология),
профессор, профессор кафедры биотехнологии,
Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский
государственный аграрный
университет - МСХА имени К.А. Тимирязева»
(ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева)



127434, Москва, Тимирязевская ул., 49
Тел. (499)-976-40-72;
E-mail: kalash0407@mail.ru

02.12.2022г.

Руководитель службы
политики и приема персонала

Подпись
заверяю

С. Г. Сивова

ознакомлена

2.12.22.



ОТЗЫВ

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

Редис (*Raphanus sativus* L.) является экономически важной корнеплодной культурой и неотъемлемой составляющей рационального питания человека, поскольку корнеплоды этой культуры содержат важные для здоровья химические вещества: фенольные соединения, витамины, минералы, аминокислоты, жирные кислоты, глюкозинолаты, флавоноиды, дубильные вещества, эфирные масла. Причём редис выращивают, как самую скороспелую овощную корнеплодную культуру. Vegetационный период составляет всего 20–30 суток.

В России редисом занято более 15 тыс. га, его производством занимаются как садоводы-любители, так и крупные аграрные предприятия. Сельхозтоваропроизводителям необходимы экономически выгодные сорта и гибриды, разнообразные по фенологическим, морфологическим, биохимическим и другим хозяйственно ценным признакам с высокой устойчивостью к болезням и вредителям с высоким качеством товарной продукции и адаптированные к новым современным способам выращивания. В связи с этим актуальным является создание нового исходного материала отечественной селекции.

Для ускорения селекционного процесса и создания генетического разнообразия можно использовать современные биотехнологические методы получения удвоенных гаплоидов. Культура изолированных микроспор *in vitro* занимает на сегодняшний день лидирующие позиции в селекционных программах в этом направлении. В семействе Brassicaceae встречаются различные по отзывчивости культуры. Для некоторых видов этого семейства уже разработаны эффективные протоколы получения ДН-растений в культуре изолированных микроспор *in vitro*. У рапса и капусты хорошо изучены биологические процессы эмбриогенеза и регенерации и активно используется в практической селекционной работе. Редис европейский, относящийся к роду *Raphanus sativus* L., является самой сложной и неотзывчивой культурой к технологии получения удвоенных гаплоидов методом изолированных микроспор *in vitro* в семействе Brassicaceae. До настоящего времени по культуре редиса европейского не было разработано эффективной технологии получения ДН-растений.

В связи с этим данное диссертационное исследование, посвящённое разработке технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* с целью создания гомозиготных линий для селекции сортов и гибридов не вызывает сомнений в его **актуальности**.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Анализ основных положений и выводов диссертационной работы Е.В. Козарь свидетельствует о её теоретической обоснованности, достоверности и практической значимости.

К научной новизне результатов диссертации следует отнести: Изучение всех этапов андрогенеза редиса европейского в культуре изолированных микроспор *in vitro* и выявление новых закономерностей формирования эмбриогенных структур. Определение факторов влияющих на отзывчивость к эмбриогенезу: размер бутона, структура популяции микроспор, способ изоляции микроспор, состав питательной среды, режима термообработки. Выявление биологических особенностей на этапе укоренения. Оптимизацию условий для индукции андрогенеза, регенерации эмбриоидов и дальнейшего органогенеза растений-регенерантов редиса европейского. Подбор питательных сред на этапах индукции эмбриогенеза и укоренения микропобегов редиса европейского. Впервые 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. Выявление оригинальных методических решений для повышения эффективности ИМС технологии редиса европейского на этапах изоляции микроспор и индукции ризогенеза. Проявление высокой частоты спонтанного удвоения гаплоидного набора хромосом растений-регенерантов редиса европейского. Разработку первого протокола получения удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор *in vitro* для редиса европейского и получение первых удвоенных гаплоидов этой культуры.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Автором диссертации получены новые сведения о закономерностях формирования эмбриогенных структур при андрогенезе редиса европейского. Предложен оригинальный способ изоляции микроспор позволяющий повысить эффективность ИМС технологии, как для редиса европейского, так и для других культур семейства Brassicaceae. Разработан принципиально новый подход к повышению эффективности корнеобразования, ранее не описанный в литературе, открывающий 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 редиса европейского 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. Получены ДН-линии редиса европейского являющиеся ценным материалом для селекции, которые также могут быть использованы в качестве объектов для генетических исследований.

Структура и объём диссертационной работы

Диссертационная работа состоит из введения, 3 разделов, заключения, рекомендаций по практическому применению результатов диссертационной работы, списка использованной литературы и 7 приложений. Она изложена на 130 страницах текста компьютерной вёрстки и содержит 7 таблиц и 34 рисунка. Список использованной литературы включает 167 источников, в том числе, 154 – иностранных авторов.

Диссертация Е.В. Козарь обладает структурной целостностью, логической завершённой и содержит подробное описание: особенностей биологических процессов эмбриогенеза у *Raphanus sativus* L., новых методических решений и подбора важных факторов на разных этапах эмбриогенеза, регенерации эксплантов, ризогенеза *in vitro* и укоренения *in vivo*, позволяющих повысить эффективность технологии и завершить полный цикл получения удвоенных гаплоидов редиса европейского. Представлены результаты практического применения разработанной технологии в селекционных программах на примере передачи в гос-сорткомиссию трёх заявок на патент на селекционное достижение – ДН-линий редиса европейского: Жегалов, Веня и Персей. Также подана заявка на патент на изобретение « Модифицированный метод изоляции микроспор в культуре микроспор *in vitro* для семейства Brassicaceae».

Обоснованность и достоверность содержащихся в работе научных положений, выводов и рекомендаций подтверждается.

Исследования Е. В. Козарь выполнены в 2017–2021 гг. на базе лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ «Федеральном центре овощеводства», Московская область, пос. ВНИИССОК.

Методический уровень выполненных соискателем исследований высокий. Автор подробно описала методику проведения исследований, что даёт возмож-

ность ясно представить ход их выполнения. Техника и методика проведения исследований замечаний и возражений не вызывают.

Материалы диссертации прошли апробацию на 10 научных форумах регионального, федерального и международного уровня. Основные результаты исследований, полученные соискателем, опубликованы в 12 научных работах, в том числе – в 2 научных статьях, опубликованных в научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ и 4 в статьях, индексируемых Scopus и Web of Science.

Наиболее значимые рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные приёмы определения оптимального размера бутонов, изоляции микроспор путём поперечного разреза каждого бутона с последующим взбалтыванием на ротационном шейкере в стерильных пробирках с жидкой средой NLN-13 в течении 1-30 секунд, использования питательной среды NLN-13 и МС-13 для индукции эмбриогенеза, продолжительности термообработки 32 °С в течении 1-2 суток рекомендовать для использования при культуре изолированных микроспор *in vitro* редиса европейского.

Питательную среду МС с 2 % сахарозы, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК, 7 г/л агара и МС с 2 % сахарозы, 0,1 мг/л БАП, 7 г/л агара рекомендовать для регенерации микропобегов редиса европейского из эмбриоидов.

Методики посадки микропобегов без заглубления на безгормональной среде МС с 2% сахарозы и 7 г/л агара и на мостиках из фильтровальной бумаги в пробирках с жидкой средой МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина, рекомендовать для укоренения микропобегов редиса европейского. В случае образования корнеплодоподобных структур в области гипокотилия микропобегов, удалить их скальпелем в стерильных условиях и повторно пересадить микропобег в новый культуральный сосуд или пробирку с твердой средой МС или жидкой средой МСм.

Замечания по диссертационной работе

Оценивая, в целом, положительно рецензируемую диссертацию, считаю необходимым отметить её некоторые недостатки:

1. Практически по всему тексту диссертации и автореферата обозначения единиц процента «%» и знаков градуса Цельсия «°С» в нарушение ГОСТ 8.417-2002, пункт 8.3 «*Правила написаний обозначений единиц*», прижаты к цифровым значениям без пробела между ними. Например: «50%», или «30°С». Правильная, по ГОСТ, запись подобных числовых выражений: «50 %», или «30 °С».

2. На стр. 8, где освещена теоретическая и практическая значимость, присутствует ссылка на литературный источник, её быть не должно. На этой же странице к практической значимости стоило бы добавить сведения о подаче заявок на патенты на селекционные достижения и на изобретение.

3. По всему тексту диссертации встречается много сокращений, которые расшифровываются гораздо позже, поэтому приходится догадываться, искать в диссертации на других страницах либо в справочниках. Например: на стр. 9 в основных положениях выносимых на защиту в п. 4 есть сокращение «РЕ», которое расшифровывается гораздо позже; сокращения «БАП» и «ГК» на стр. 31. расшифровывается на стр. 39; в начале стр. 76 сокращение «ТДЗ» расшифровывается только в конце страницы и т.д.

4. На стр. 9 в описании апробации результатов ошибочно написан номер Международной конференции «УШ» – таких римских цифр не существует. Также в этом пункте есть ошибки в написании названий конференций.

5. На стр. 25 и стр. 64 автор путает кириллицу и латиницу: (Домблидес et al., 2016) и (Рисунок 12 Б), а нужно (Domblides et al., 2016) и (Рисунок 12 В).

6. На стр. 3 в «Оглавлении» и стр. 40, п. 2.7.1. повторяется дважды.

7. На стр. 44 в п. 2.13.2 во втором абзаце в третьем и пятом предложении автор указывает цифры без единиц измерения, что затрудняет восприятие информации.

8. Таблица 1 на стр. 46 загружена одной и той же информацией. В названии таблицы и шапке повторяется фраза: «на поздней одноклеточной вакуолизированной и ранней двухклеточной стадиях развития». Во всех таблицах должны быть запятые вместо точек.

9. По всей диссертации надписи в графиках выполнены не шрифтом «Times New Roman», как это требуется при оформлении диссертационной работы.

10. На стр. 56 в названии рисунка 6 отсутствует упоминание одного из представленных в диаграмме факторов – «случайные факторы».

11. В тексте диссертации встречаются ошибки следующего характера: в словах пропущены буквы, в слове нарушен порядок букв, в слове имеются лишние буквы. Встречаются не законченные предложения.

12. В главе по изучению влияния питательных сред на ризогенез микрополюгов редиса европейского используется жидкая питательная среда МСм с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 2% сахарозой, что вызывает вопросы, поскольку обычно добавление цитокининов используют для индукции побегообразования и считается, что цитокинины подавляют ризогенез.

Однако, в целом, все отмеченные недостатки носят частный характер, не снижают ценности и значимости диссертации, и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертационная работа Козарь Елены Викторовны «**Разработка технологии получения удвоенных гаплоидов редиса европейского (*Raphanus sativus* L.) в культуре изолированных микроспор *in vitro***» имеет научное и практическое значение и является законченным научным трудом. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Основные результаты исследований диссертации полно отражены в публикациях.

Настоящая диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» ВАК Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Е.В. Козарь заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. – селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Официальный оппонент:
заведующая отделом селекции
рапса и горчицы
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
кандидат биологических наук
(специальность 06.01.05)

Л.А. Горлова

Почтовый адрес: 350038, Россия,
Краснодарский край, г. Краснодар,
ул. Филатова, д. 17, тел.: (861) 275-78-45
e-mail: lagorlova26@yandex.ru

Подпись заведующей отделом
селекции рапса и горчицы
Людмилы Анатольевны Горловой
заверяю:

учёный секретарь
ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК
кандидат биологических наук

02.12.2022



6

М. В. Захарова
02.12.22