

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА НА ДИССЕРТАЦИОННУЮ РАБОТУ АЛЖАРАМАНИ НАСИМ «ПОИСК ИСТОЧНИКОВ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОГО УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОРКОВИ (*D. CAROTA* L.)», ПРЕДСТАВЛЕННОЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 4.1.2. СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ (БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ).

Актуальность темы диссертационного исследования. Морковь выращивается практически во всех странах мира. Китай остаётся лидером в производстве, занимая 45% мирового производства, Россия занимает пятое место в мировом рейтинге возделывания моркови. Данная культура представлена большим биоразнообразием форм. Обширные генетические ресурсы моркови позволяют проводить селекцию на постоянное улучшение хозяйственно ценных признаков. В последнее время большое внимание уделяется созданию гибридов F₁, отличающихся высокой продуктивностью, однородностью и качеством. Для создания гибридов F₁ используют признак цитоплазматической мужской стерильности, который минимизирует затраты при гибридизации и позволяет получить стопроцентное поколение. Известно, что у других культур использование технологии слияния протопластов была основой для передачи стерильности из одной разновидности в другую, например, в роде *Brassica*, *Cichorium*, *Lycopersicon*. Разработка новых источников мужской стерильности может значительно расширить возможности селекции, и в некоторых случаях упростить поиск линейного материала, избегая сложных схем для проведения скрещиваний. Кроме того важно получить линейный материал с мужской стерильностью которая не будет подвержена воздействию внешних факторов. В данном случае поиск генисточников стерильности можно проводить в родственных видах, диких формах. Метод культуры протопластов уже давно используется как базовая технология для манипуляции с геномами и получение новых форм. В связи с этим работа Алжарамани Насим становится методически актуальной для

решения проблем селекции моркови не только в попытке получения новых генотипов, но и в плане разработки методов и протоколов работы с протопластами растений.

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

Исходя из актуальности темы все научные положения отличаются обоснованностью и возможностью реализации с использованием современных методов биотехнологии растений. Выводы в заключении соответствуют тем задачам, которые перед собой поставил автор для достижения общей цели работы. Рекомендации сформированы на основании практической значимости результатов. По материалам диссертации выпущено шесть научных работ, три из которых в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, три статьи в сборниках тезисов РИНЦ. Основные результаты работы представлены на восьми международных конференциях.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций. Исследования проведены на достаточном объёме экспериментального материала, результаты статистически обработаны с использованием дисперсионного анализа с применением программ Microsoft Excel и PAST. Во всех экспериментах использованы современные методы и протоколы. Научная новизна работы заключается в поиске и детальном морфологическом изучении признака стерильности у фенхеля и сельдерея, что оказывается крайне ценным при возможной работе по гибридизации данных культур. С практической точки зрения выявлены формы с мужской стерильностью, и проведено сравнение признака мужской стерильности у различных представителей семейства Сельдерейные. Выявлено значимое влияние факторов «концентрация осмотического агента» и «экспозиция» на выход жизнеспособных протопластов. Подобраны оптимальные условия — 0,5 М сорбита и 6-часовая экспозиция, которые обеспечивают максимальную жизнеспособность протопластов из 5-недельных листьев моркови. Установлена закономерность, согласно которой увеличение времени ферментативной

обработки листьев 5-недельных проростков моркови с использованием 1% (W/V) целлюлазы и 0,1% (W/V) пектиназы повышает выход протопластов, но снижает их жизнеспособность. Разработаны элементы технологии хемослияния протопластов моркови из мезофилла листа с протопластами фенхеля из каллуса с частотой образования бинуклеарных гетерокарионов $4,6 \times 10^4$ при исходном количестве протопластов в суспензии 2×10^5 . Опробована техника слияния протопластов методом электропорации. Выводы в заключении оформлены соответственно анализа научных данных, рекомендации сформулированы на основании детального анализа результатов.

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

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

Оценка содержания диссертации. Объем диссертации составляет 148 страниц компьютерного текста, состоит из введения, основной части, содержащей 6 таблиц, 44 рисунка, заключения, библиографического списка из 158 источника, большинство из которых на иностранном языке.

Аналитический обзор проблематики исследования занимает 45 страниц, где очень подробно изложены вопросы селекции с использованием мужской стерильности, современные методические аспекты использования культуры

протопластов для соматической гибридизации с целью решения задач селекции для культурных растений Solanaceae, Brassicaceae, Apiaceae, Poaceae или Gramineae, Rutaceae. Автор приводит примеры успешного создания стерильных форм при использовании технологии слияния протопластов. Так как работа посвящена использованию культуры протопластов, то большое внимание отведено методическим аспектам от выделения протопластов, их очистки, подбора условий для культивирования, включая питательные среды до возможности регенерации растений. Приведены конкретные факты об использовании протопластов растений для осуществления цибридизации.

Глава «Материалы и методы» занимает 20 страниц, где представлены все методические аспекты диссертационной работы. Для оценки генетических факторов стерильности растений был использован протокол ПЦР для определения генов стерильности в цитоплазме моркови, фенхеля, сельдерея. Полученные ПЦР фрагменты затем были расшифрованы по Сенгеру. Половое скрещивание между растениями моркови и сельдерея с последующим культивированием семязачатков для спасения зародышей в условиях *in vitro*. Большая часть методов отведена для осуществления соматической гибридизации, включая подбор исходного материала, непосредственную изоляции протопластов, оптимизацию методов для получения высокой плотности протопластов с использованием суспензии каллусных клеток, изоляцию протопластов мезофилла из проростков моркови, изоляцию протопластов из клеточной суспензии фенхеля. После получения протопластов были использованы методы для их культивирования и возможной регенерации. Для создание линий с мужской стерильностью были применены методы хемослияния и слияние под воздействием электрического тока. Последний подход не дал положительных результатов и требует дальнейшего изучения. В главе результатов исследования были подробно описаны морфологические особенности растений фенхеля, сельдерея с мужской стерильностью. С применением ДНК- маркеров удалось выявить стерильность *неталоид* у растений моркови и подтвердить ПЦР- продукт на основе расшифровки

последовательности полученных ампликонов. Половая гибридизация фенхеля и сельдерея с морковью не дала положительных результатов, поэтому автор направил исследования на получение соматических гибридов. В ходе исследований были выделены протопласты из мезофилла листа с использованием трёх различных протоколов изоляции по Sofiari et al. (1998), Baranski et al. (2007), Meyer et al. (2022). Наилучшим подходом оказался метод согласно Baranski и др. со средним значением плотности протопластов 12340 и успешности выделения 61%. Однако эти методы не обусловили высокого выхода протопластов, что потребовало модернизации существующих подходов. Более высокий уровень выхода протопластов из клеточной суспензии был зафиксирован с протоколом Grzebelus et al., (2012) (с плотностью протопластов 15798, и успешностью выделения 82%) для каллусной ткани, но процент жизнеспособных протопластов был все-таки ниже, чем с протоколом по Wen et al. (2012). В конечном итоге был разработан собственный метод для выделения протопластов мезофилла листа моркови и метод для изоляции протопластов из клеточной суспензии фенхеля, где были успешно получены культуры протопластов для этих видов с выходом хлоропластов более 70000 и жизнеспособностью выше 80%. Особое место в работе занимает проблема регенерации растений из протопластов. Было сделано предположение, что тип цитокинина не критичный фактор для регенерационной компетентности фенхеля. В данной ситуации TDZ (тидиазурон) становится ценным инструментом для биотехнологии растений, поскольку он позволяет эффективно стимулировать регенерацию побегов из протопластов растений. Кроме того установлено, что тип исходной растительной ткани, которая используется для выделения протопластов может быть решающим фактором для процесса регенерации. Высокую регенерационную способность имеют протопласты, полученные из клеточной суспензии. В разделе работы по слиянию протопластов моркови с родственными видами были получены гибридные клетки между видами фенхеля и моркови. Для получения таких клеток было использовано два подхода хемослияние и электропорация. При

хемослиянии частота слияния достигала 46%. В результате проведенных исследований, представленных в диссертации разработаны эффективные методы изоляции протопластов моркови, фенхеля. Получены гибридные клетки в результате слияния протопластов между двумя видами фенхеля и моркови, что может быть использовано для технологий улучшения и получения нового селекционного материала в культуре моркови. Результатом исследовательской работы стало создание эффективного метода выделения большого числа жизнеспособных протопластов, которые могут быть использованы для дальнейших методических решений. Тем не менее на основании анализа диссертационной работы **Алжарамани Насим** имеются следующие замечания и пожелания:

- в главе «материалы и методы» описание экспериментального растительного материала представлено не достаточно, отсутствует информация об растительных образцах для исследования, не обоснована причина выбора именно этих генотипов;

- в изложении результатов исследований автор где-то возвращается к подробным описаниям методов исследований, что желательно располагать в главе «материалы и методы»;

- фенхель и морковь генетически достаточно разные виды, поэтому получить семена крайне маловероятно, есть опыт когда другие виды используют в качестве гаплопродюсеров, и появляется возможность инициировать семена моркови через апомиксис. При опылении пыльцой моркови соцветий фенхеля была вероятность получить гаплоидные семена фенхеля, и в этом случае морковь не выступает в качестве объекта исследований. В данном случае аллоплазматические линии возможно получить с использованием других видов *Daucus*, как описано в работе Nothnagel T. за 2000, и действительно, улучшить культуру моркови;

- не очень понятен третий вывод в заключении в связи с теми замечаниями, которые были сделаны выше;

- при оценке стерильности моркови отмечено не совпадение в результатах анализа для пар праймеров *cmt3 – apt1d1*, *cmt4 - apt1d1* и *cmt1 – cmt2*. Можно ли говорить о том, что выбор маркеров для данного исследования был оправданным, так как известны праймеры, которые позволяют выявить стерильность типа *петалويد*. Можно было использовать больше пар праймеров для оценки. Также встаёт вопрос показывали ли анализируемые растения фенотипическое проявление мужской стерильности, в диссертации таких сравнений не приводится;

- при изучении стерильности моркови было указано, что ДНК-маркеры были отобраны из работы Чистовой А.В. как из основного источника, но там данные маркеры были только использованы, тогда как на самом деле они разработаны другими авторами, а именно в публикации Wach, I.C., Olesen, A., Simon, P.W. за 2002 г.;

- мужская стерильность сельдерея была описана уже в публикации 1986 года Quiros C.F. и др., а более подробное описание было представлено в 2023 году. Мужская стерильность фенхеля описана в публикации 2020 года Palumbo F. и др. Данные публикации не были проанализированы. Также можно отметить не совсем полный обзор по мужской стерильности моркови и её практическому использованию;

- в таблице 5 представлены результаты двухфакторного дисперсионного анализа, но в описании результатов не даны цифры и доли влияния каждого из факторов, ошибка опыта, то, что было бы важно для выявления закономерностей метода;

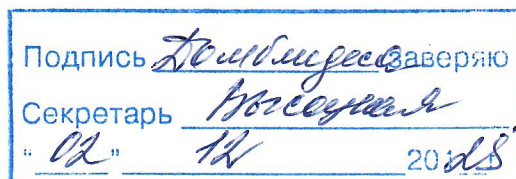
- сокращение LSD что приводится в англоязычных публикациях, вместо него нужно указывать НСР при оценке наименьшей статистической разницы. Кроме того, на рисунках 29, 30 трудно судить о достоверности различий,

- в подписи к рисунку 32b указано, что проростки моркови до *трансформации*, хотя речи о трансформации моркови в данном исследовании нет;

В целом замечание и пожелания не снижают качество проведенных исследований, в которых нужно отметить значительный методический аспект с разработкой новых эффективных подходов для изолирования и слияния протопластов растений. Метод переноса признаков слиянием протопластов достаточно известен и позволил решить задачи селекции, поэтому применение данного метода очень перспективно.

Заключение. Диссертационная работа на тему «Поиск источников мужской стерильности и разработка методов генетического усовершенствования моркови (*D. carota* L.)» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на значительном методическом уровне, обладающую научной новизной, практической и теоретической значимостью и отвечает всем критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», а её автор, **Алжарамани Насим**, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (биологические науки)

Официальный оппонент,
Домблидес Артур Сергеевич
доктор сельскохозяйственных наук
(06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений),
заведующий лабораторией
молекулярной генетики и цитологии,
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр овощеводства»
Адрес: 143080 Московская область,
Одинцовский г.о., п. ВНИИССОК,
улица Селекционная, 14
Тел. +74955992442;
e-mail: priemnaya@vniissok.ru



2 декабря 2025 г.