

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Осминой Екатерины Васильевны на тему «Создание исходного материала для селекции партенокарпического огурца с применением биотехнологических и классических методов», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2 Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Актуальность темы диссертационного исследования.

Технология создания удвоенных гаплоидов (DH) широко используется в современной селекции растений с целью существенного сокращения сроков, необходимых для создания F1 гибридов. В связи с этим одним из приоритетных направлений в селекции и биотехнологии является разработка высокоэффективных протоколов по получению удвоенных гаплоидов. Число исследований гиногенеза у огурца незначительное, что вызывает необходимость в изучении и оптимизации технологии создания удвоенных гаплоидов огурца.

Снижение затрат при производстве гибридных семян является важным аспектом в селекции овощных культур. Одним из способов, позволяющих упростить гибридное семеноводство партенокарпического огурца, является использование гиноцийных линий с проявлением женского типа цветения. В результате этого исключается этап обработки отцовского компонента нитратом серебра для индукции образования узлов с мужскими цветками, а анализ аллельного состояния гена *F* позволит выявить гиноцийные линии для дальнейшего использования F1 гибридов партенокарпического огурца.

Создание устойчивых к распространенным заболеваниям F1 гибридов является наиболее экономически значимым, позволяющим повысить продуктивность овощных культур и снизить пестицидную нагрузку при их выращивании.

Оценка новизны и практической значимости исследований.

Результаты, представленные в диссертационной работе, имеют научную и практическую ценность для оптимизации состава индукционных питательных сред с целью повышения частоты индукции гиногенеза у огурца и повышения эффективности DH-технологии. Установлено, что добавление гидролизата казеина и глутатиона в питательную среду способствует стабильному формированию эмбриоидов. Замена сахарозы на глюкозу доказала свою эффективность для индукции неопылённых семян в

культуре завязей, что особенно важно для работы с линиями с низкой эмбриогенной способностью.

Выявлены гиноцийные линии партенокарпического огурца, связанные с аллелями гена *F*, определяющего женский тип цветения. Выделены гибридные комбинации, сочетающие высокую продуктивность и толерантность к ложной мучнистой росе, рекомендуемые в качестве исходного материала для создания F1 гибридов огурца.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность. Достоверность научных положений, заключений, рекомендаций, сформулированных в работе, подтверждена экспериментами, выполненными с применением современных методов исследований, пакета прикладных программ и опирается на результаты статистического анализа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа имеет классическую структуру: изложена на 125 страницах, состоит из введения, основной части, заключения и включает 23 таблицы, 16 рисунков, 1 приложение. Библиографический список включает 142 источника, в том числе 98 на иностранных языках.

Глава 1 представляет собой обзор литературы отечественных и зарубежных источников по теме исследований. Автор рассматривает и обсуждает вопросы происхождения, распространения, народнохозяйственного значения огурца, основные направления селекции по этой культуре. Детально проанализированы методы создания удвоенных гаплоидов огурца: партеногенез, андрогенез, гиногенез. Анализируются факторы, влияющие на эффективность технологии гиногенеза. Проработана проблема устойчивости к заболеваниям огурца, особое внимание уделено пероноспорозу. Уделяется внимание проблеме использования гиноцийных линий с сильным проявлением женского пола при получении гибридов огурца.

В **главе 2 «Материалы и методы»** автор указывает место проведения исследований, описывает генетический растительный материал и условия выращивания растений-доноров. Приводится методика выполнения биотехнологических работ, необходимых для получения ДН-растений огурца, использование питательных сред. Приведено описание методов изучения материала по степени проявления гиноцийности и устойчивости новых гибридных комбинаций партенокарпического огурца к ложной мучнистой росе.

В Главе 3 «Результаты и обсуждение» представлены результаты исследований в соответствии с целью и поставленными задачами. В разделе 3.1. представлены результаты изучения влияния различных факторов на частоту индукции гиногенеза: типа экспланта, генотипа донорного растения, состава питательной среды, антиоксидантов, регуляторов роста и органических соединений. Показано, что повышение частоты эмбриогенеза у низкоотзывчивых образцов огурца происходит при замене 3 % сахарозы на 3 % глюкозу в индукционной питательной среде и использовании завязи, отобранной в стадии полураскрытого цветка. Установлено, что добавление антиоксиданта глутатиона и гидролизата казеина в питательную среду, а также сочетание регуляторов роста значительно повышает частоту эмбриогенеза. Проведена оценка уровня ploидности сформированных растений-регенерантов с помощью проточного цитометра. В разделе 3.2 изложена оценка проявления женского типа цветения по аллельному состоянию гена F, отвечающему за дифференцировку пола. В результате выявлены перспективные линии для использования в качестве материнского компонента. Оценка комбинационной способности линий огурца по основным признакам: продуктивность, масса плода, число плодов, число побегов 1-го порядка ветвления. Раздел 3.3 посвящён оценке устойчивости полученных линий и гибридных комбинаций к пероноспорозу, выделены перспективные гибридные комбинации, сочетающие высокую продуктивность и толерантность. В диссертации присутствует большое количество иллюстративного материала. Заключение достаточно полно отражает содержание диссертации.

Основные положения диссертационной работы доложены на 3-х международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 3 в сборниках докладов и тезисов.

Замечания и пожелания по диссертационной работе.

1. Согласно разделу 2.4, поражение пероноспорозом оценивали по 10-балльной шкале, где степень поражения выражалась как процент площади поврежденного листа от его общей площади. Однако из представленных данных не ясно, каким образом автор определял поражение на 8 баллов (87–99% поражения), на 9 баллов (100% поражения) и какое поражение соответствует 10 баллам. Необходимо уточнить критерии оценки, особенно для случаев с максимальной степенью поражения.

2. Почему оценку пораженности растений пероноспорозом начали только при поражении стандарта восприимчивости свыше 85%? Есть такая методика? Почему не с первых симптомов или через равные промежутки времени (например, каждые 7-14 суток)?
3. Неясно, почему автор в исследовании сначала изучает влияние состава питательной среды на частоту эмбриогенеза (разделы 3.1.3–3.1.4), затем переходит к анализу влияния стадии развития экспланта (раздел 3.1.5), а потом снова возвращается к изучению влияния состава питательной среды на частоту индукции эмбриогенеза (раздел 3.1.6-3.1.8).
4. В разделе 3.1.1 автор использует два способа введения эксплантов в культуру, ссылаясь на работы, в которых применялись различные питательные среды (указано в разделе 2.2.3 «Материалы и методы»), однако не уточнено, какую именно среду выбрал автор для своего исследования.
5. Стр. 40 «...Сахар – один из ключевых факторов, влияющих на образование каллуса в культуре *in vitro*» - неверное использование научной/химической терминологии. Сахар – это продовольственный товар, а в состав питательной среды в обязательном порядке включают углеводороды, которые чаще всего представлены дисахаридом - сахарозой.
6. На рис. 4, рис.5, рис.9, рис. 10 – отсутствует линейная шкала, в связи с этим очень тяжело сделать вывод о происходящих морфогенетических процессах. Следует уточнить, как происходил морфогенез: по пути образования биполярной (эмбриогенез) или монополярной (органогенез) структуры?
7. Не понятно, чем обусловлен выбор регенерационной питательной среды (стр.55...*В качестве регенерационной питательной среды использовали MS, дополненную 1,5 мг/л 6-BAР, 3 % сахарозой и 0,8 % агаром*). В ней из регуляторов роста присутствует только цитокинин. Почему последующие пересадки каждые 2 недели производили на эту же среду, почему не вводили ауксины, гиббереллины (в случае образования укороченных побегов, которые присутствуют на рис.7, это обязательно) или пересадку на безгормональную среду для укоренения?
8. На стр. 70 «...Однако, растения-регенеранты удалось получить не у всех образцов...» - при этом из текста диссертации не ясно, а получились ли вообще растения, или только эмбриониды и уродливые регенеранты, так как из рисунка 6 представляется маловероятным выживание «адаптированного растения». Из скольких генотипов были получены ДН растения, сколько их было всего и удалось ли в дальнейшем получить семенное потомство?

9. Данные по результатам оценки на уровень ploидности с использованием проточной цитометрии клеточных ядер представлены не очень корректно. На рис. 8Б - для оценки октаploидной популяции зафиксировано очень мало событий. Отсутствует информация какое растение было использовано в качестве контрольного диплоидного образца (сорт, из семени или из культуры *in vitro*)?

10. Сделанный автором вывод о связи количества анализируемых ядер со стрессом растений-регенерантов при культивировании *in vitro* "...Сниженное количество анализируемых ядер растений-регенерантов, выявляемое по высоте пиков на графике (рис. 8Б) может указывать на возможный чрезмерный стресс растений-регенерантов при культивировании *in vitro*, который в последующем, вероятно отражается и на низкой регенерационной способности эмбриоидов, и на низкой выживаемости растений-регенерантов при укоренении и адаптации." не всегда верный, это может говорить о неудачной пробоподготовке и о качестве самого образца (каллусная ткань, мало ткани, плохое состояние ткани, наличие фенольных соединений и пр.).

11. По вопросу высокоустойчивых сортов к пероноспорозу. Насколько мне известно, устойчивых или иммунных к данному заболеванию образцов огурца нет. Устойчивостью обладает только чайот, люффа, может в работе лучше указать, что образцы толерантные.

Однако, отмеченные замечания и пожелания не снижают качества исследований, они не влияют на главные результаты диссертации, описанные выше. Результаты оригинальные, обладают научной новизной и практически значимы, демонстрируют вклад диссертанта в область современной селекции и биотехнологии. Это характеризует соискателя как вполне сложившегося исследователя, умеющего самостоятельно ставить и решать сложные селекционные задачи с использованием комплекса современных биотехнологических методов.

Заключение по диссертационной работе.

Диссертация Осминой Екатерины Васильевны по теме «Создание исходного материала для селекции партенокарпического огурца с применением биотехнологических и классических методов» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, имеющую значение для российской науки и практики. Материалы автореферата отражают основное содержание диссертации, изложены в достаточном объеме для раскрытия основных положений, выносимых на защиту. По материалам

диссертации опубликовано пять печатных работ, две из них в журналах, рецензируемых ВАК РФ. Диссертация соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», утверждённым Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013, а ее автор – Осминина Екатерина Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. – Селекция, семеноводство и биотехнология растений.

Официальный оппонент,

Пышная Ольга Николаевна

доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
главный научный сотрудник, заместитель
директора по научной работе

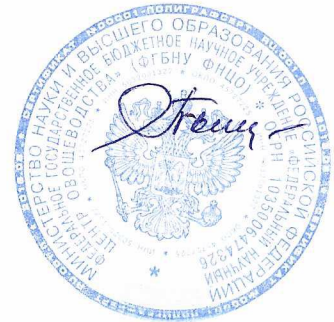
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный научный центр овощеводства»

Адрес: 143080 Московская область,

Одинцовский район, п. ВНИИССОК, ул. Селекционная, 14

Тел. +7903-506-1864;

e-mail: pishnaya_o@mail.ru



04 декабря 2024г.

Подпись Осминина заверяю
Секретарь Васильева
" 04 " 12 2024 г.