

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Ермолаева Алексея Станиславовича** «Создание линий желтоплодного кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) с использованием биотехнологических и классических методов селекции», представленную к защите в диссертационном совете 24.1.248.01 на базе ФГБНУ «Федеральный научный селекционно - технологический центр садоводства и питомниководства» на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Актуальность темы исследования. Большая экономическая значимость представителей семейства Cucurbitaceae Juss., вида *Cucurbita pepo* L. кабачка и патиссона, имеющих широкую адаптацию от умеренного климата до тропиков, и выращиваемых для реализации свежих плодов в фазе технической спелости и консервирования, обуславливает необходимость создания отечественных гибридов этих культур, превышающих по урожайности, раннеспелости, устойчивости к вредителям и болезням, гибриды иностранной селекции. Большое генетическое разнообразие, заложенное у этого вида и проявляющееся в разнообразной окраске, размере и форме плодов, морфологии листьев, размере растений, сроках созревания и хранения в фазе технической спелости, все это позволяет селекционерам создавать новые и улучшать представленные на рынке сорта и гибриды в соответствии с все возрастающими запросами потребителей.

Одним из важнейших этапов в селекции F_1 гибридов овощных культур, в частности кабачка и патиссона, является получение гомозиготных родительских линий. Получение инбредных линий, необходимых для создания F_1 гибридов традиционными методами селекции является крайне длительным и трудоемким процессом. В последнее время технология получения удвоенных гаплоидов (DH) на основе индукции гиногенеза, стала альтернативой классическим методам селекции и позволяет создавать чистые (100% гомозиготные) DH линии за один или два года. Культура неопыленных семяпочек *in vitro* является одной из наиболее перспективных и востребованных DH-технологий, применяемых для овощных культур семейства Cucurbitaceae.

Традиционная селекция, сама по себе, больше не может поддерживать глобальный спрос в условиях роста численности населения. Таким образом, будущее селекции заключается в интеграции классических методов с достижениями биоинформатики, биохимии, молекулярной генетики, молекулярной биологии, геной инженерии и биотехнологии.

В связи с этим, работа соискателя Ермолаева Алексея Станиславовича, направленная на оптимизацию этапов технологии получения удвоенных гаплоидов кабачка и патиссона в культуре неопыленных семяпочек *in vitro* и получение исходного гомозиготного селекционного материала с насыщенной желто-оранжевой окраской плодов и комплексом хозяйственно-ценных признаков с использованием биотехнологических и классических методов селекции, является актуальной, востребованной и имеет большую практическую значимость.

Оценка новизны и практической значимости исследований. В настоящее время имеется достаточно большое разнообразие исследований по созданию удвоенных гаплоидных растений, однако, эффективность этих технологий остается

в большинстве случаев нестабильной, генотипспецифичной и требует индивидуального подбора условий культивирования для каждого генотипа. Данное исследование направлено на изучение факторов, влияющих на индукцию гиногенеза и на получение максимального количества гомозиготных растений. В работе было проведено усовершенствование отдельных элементов технологии получения ДН растений кабачка и патиссона в культуре неопыленных семян *in vitro*. Были разработаны эффективные протоколы оценки уровня плоидности растений-регенерантов, относящихся к виду *C. pepo*. Были подобраны два SSR маркера (СМТm61 и СМТmС27), которые могут быть использованы для оценки происхождения полученных растений-регенерантов кабачка в культуре неопыленных семян *in vitro*. Впер вые с использованием сканирующего электронного микроскопа было проведено изучение морфологических особенностей пыльцы и получены изображения пыльцевых зерен у гиногенных растений кабачка и патиссона с разным уровнем плоидности. Из полученных гиногенных растений патиссона в условиях провокационного инфекционного фона были выделены ДН - растения, с насыщенно желтыми плодами, обладающие преимущественно женским типом цветения и толерантностью к эпифитотиям мучнистой росы (*Erysiphe cichoracearum*). В результате проведенной работы были выделены диплоидные и тетраплоидные гиногенные линии кабачка и патиссона с желтым цветом окраски кожуры и обладающие хозяйственно ценными признаками, которые будут включены в селекционный процесс и могут также быть использованы в качестве объектов для генетических исследований. Впервые удалось получить потомство от скрещиваний между диплоидными и тетраплоидными гиногенными линиями и получить триплоидные гибриды кабачка и патиссона.

Степень достоверности научных исследований, выводов и рекомендаций. Представленная диссертация является завершенной научно-квалификационной работой. Результаты исследований и основные положения диссертационной работы были представлены, обсуждены и одобрены на шести международных и всероссийских конференциях различного уровня. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе из них 3 в рецензируемых научных журналах в изданиях, входящих в перечень ВАК РФ, 1 работа в рецензируемом журнале Scopus, Web of Science, принято участие в 1 заявке на патент селекционного достижения. Таким образом, достоверность и обоснованность полученных результатов не вызывает сомнений.

Практическая ценность работы заключается в усовершенствовании отдельных элементов технологии получения ДН растений в культуре неопыленных семян *in vitro*, позволяющих получать до 55 эмбриоидов на одну культивируемую завязь, что превосходит по эффективности технологии, отраженные в литературных источниках для вида *C. pepo*; разработке эффективных протоколов оценки уровня плоидности растений-регенерантов, относящихся к виду *C. pepo*.

Полученные классическими методами линии кабачка (I₄ Ясмин 21/194 и I₄ Святозар 21/221) и с использованием биотехнологических методов (10 гиногенных линий кабачка и 9 линий патиссона) могут быть включены в селекционный процесс для создания гетерозисных желтоплодных гибридов кабачка и патиссона с комплексом хозяйственно ценных признаков.

Теоретическая ценность работы заключается в том, что полученные результаты могут быть применены в проведении лабораторно-практических работ по дисциплинам «Сельскохозяйственная биотехнология», «Прикладная биотехнология», «Культура клеток и тканей растений» для студентов, обучающихся по направлениям «Биотехнология» и «Агрономия» ученых, занимающихся в этой области с представителями *C. pepo*.

Структура и содержание диссертации. Текст диссертации состоит из введения, трех глав, заключения, рекомендаций по практическому применению результатов диссертационной работы, списка использованной литературы и приложений. Диссертация изложена на 171-й странице компьютерного текста. Работа содержит 15 таблиц, 32 рисунка и 7 приложений. Список литературы содержит 189 источников, из них – 154 иностранных авторов.

Первая глава носит обзорный характер, в которой автор освещает народно-хозяйственное значение, морфологические и биологические особенности кабачка и патиссона, последовательно описывает проблемы, связанные с получением удвоенных гаплоидов в культуре изолированных семян, анализирует отечественные и зарубежные литературные источники о современном состоянии селекции кабачка и патиссона и разработанных протоколов, используемых в области получения удвоенных гаплоидов у *C. pepo*. На основании проведенного анализа была сформулирована цель, поставлены задачи и разработана программа исследований.

Во второй главе отражены материалы и методы исследования. Приводятся агрометеорологические условия для места выращивания коллекционных и селекционных образцов в годы проведения экспериментов по диссертационной работе в условиях открытого грунта и представлена методика проведения оценки селекционного материала по комплексу хозяйственно-ценных признаков.

Подробно описаны биотехнологические этапы работ, необходимые для создания успешной технологии получения ДН-растений кабачка и патиссона при использовании культуры неопыленных семян *in vitro*: отбор бутонов на оптимальной стадии развития женского гаметофита; стерилизация эксплантов; используемые питательные среды и условия их приготовления; изоляция семян и введение в культуру *in vitro*; температурные обработки; цитологические наблюдения за развитием семян в культуре *in vitro* и развитием эмбрионов/каллуса; получение растений-регенерантов; адаптация к условиям *ex vitro* и выращивание растений-регенерантов; проведение самоопылений растений-регенерантов R0 и R1 и получение семенного потомства.

Описана используемая методика выделения ДНК из растений кабачка и патиссона и условия проведения SSR-анализа. Дано подробное описание определения ploидности растений с использованием метода проточной цитометрии клеточных ядер, идентификации ploидности растений-регенерантов на основе морфометрических параметров абаксиального эпидермиса и пропионолактоидного метода окраски хромосом.

Приводится методика оценки фертильности пыльцы с использованием дифференциального красителя и подготовка препаратов для получения изображений с использованием электронного сканирующего микроскопа.

Из всего вышеуказанного следует, что диссертант в своей работе применял актуальные, современные методы исследования на высоком методическом уровне,

а достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как данные экспериментов были статистически обработаны.

Третья глава посвящена результатам диссертационного исследования, на основании которых делаются соответствующие выводы. В первой части главы, посвященной классической селекции, представлена актуальная для производителей и потребителей модель сорта для кабачка и патиссона, достижению показателей которой стремились в данном исследовании. В результате проведенной оценки образцов кабачка и патиссона в коллекционном и гибридном питомниках для кабачка выделены ген-источники скороспелости – генотипы Фараон, F₁ Желтый банан, Русские Спагетти, Уголек, Якорь и Ролик; по форме плода - Фараон, Желтоплодный, Золотинка и F₁ Gold Rush; Русские спагетти и Уголек, по толщине мякоти - Якорь и Ролик. Выявлено, что все изученные образцы патиссона могут быть использованы в качестве ген-источников по форме плода и толщине мякоти; сорт Диск, Чебурашка и F₁ Sunny Delight - в качестве ген-источников скороспелости, а образцы F₁ Sunny Delight, Копейка, НЛО оранжевый и F₁ Солнечный зайчик – по признаку оранжевой окраски коры.

В результате использования методов классической селекции выделены лучшие линейные формы кабачка с плодами без ребер оранжевой окраски цилиндрической формы со сбегом к плодоножке - I₄ Ясмин 21/194, с толщиной мякоти 2,5-3 см и I₄ Святозар 21/221 с толщиной мякоти 2,5 см. Выделена по срокам цветения женскими цветками линия кабачка I₄ Святозар'21/221, у которой цветение начиналось уже через 36 суток. Проведение иммунологической оценки позволило выделить линии кабачка I₅ Святозар (22/E9) и I₅ Святозар (22/E10) с наибольшей толерантностью к патогенам мучнистой росы.

Во второй части главы, посвященной биотехнологии, освещены результаты экспериментальных исследований по разработке элементов технологии получения ДН растений кабачка и патиссона в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*. После оптимизации отдельных элементов технологии была выявлена отзывчивость к гиногенному развитию у 30 из 42 изученных генотипов *C. pepo* и впервые были получены гомозиготные растения патиссона за один вегетационный период. Удалось достичь максимального выхода эмбриоидов у образцов патиссона - до 16 эмбриоидов на 100 культивируемых семяпочек, а для генотипов кабачка – до 55 эмбриоидов.

В диссертационной работе представлен большой объем экспериментальных исследований, проведенный с использованием трех различных методов, по оценке растений – регенерантов, полученных в культуре *in vitro*, на уровень ploидности. Полученные результаты позволили выявить, что среди адаптированных к условиям *ex vitro* гино генных растений *C. Pepo* на ибольшее число было диплоидными – 32,35%, частота встречаемости триплоидов составила – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоиды (n) были обнаружены только среди растений в культуре *in vitro*.

Оптимизация протокола проточной цитометрии клеточных ядер и проведенная оценка селекционных образцов кабачка и патиссона позволили установить два цитотипа для диплоидных образцов *C. pepo* с содержанием ДНК $2C = 1,07 \pm 0,03$ пг для образцов кабачка, относящихся к *subsp. pepo*, и второй цитотип $2C = 0,95 \pm 0,03$ пг для образцов патиссона, относящихся к *subsp. ovifera*.

Следует отметить тщательно проведенное изучение морфологических особенностей пыльцы с использованием сканирующего электронного микроскопа и демонстрация полученных результатов в диссертационной работе в виде изображений пыльцевых зерен кабачка и патиссона разного уровня плоидности.

Благодаря проведению оценки растений-регенерантов с использованием SSR маркеров получено подтверждение их гиногенного происхождения, так как более 70% проанализированных были гомозиготными.

Следует заметить, что особую актуальность для практической селекции имеет продемонстрированная диссертантом технология создания бессемянных плодов кабачка на основе проведенных скрещиваний между диплоидными и тетраплоидными линиями, полученными в культуре изолированных семян *in vitro*.

Все выводы соответствуют поставленным задачам, выстроены и изложены в четкой последовательности. В диссертационной работе изучаются различные факторы, оказывающие влияние на эмбриогенез в культуре изолированных семян, что находит отражение в виде девяти выводов заключения, отражающие результаты изучения факторов, оказывающих влияние на эмбриогенез.

Приведенное заключение и практические рекомендации вытекают из теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертации, и представляют практический интерес. В практических рекомендациях указано, что диссертант принимал участие в создании сорта желтоплодного кабачка, который был передан на испытание в ГСИ, в 2022 году, под названием «Московское Кружево».

Работа проиллюстрирована большим количеством подробных таблиц, рисунками и фотографиями. В целом диссертационная работа представляет собой единую научную работу, логично и последовательно изложенную и представленную к защите в виде завершеного труда.

Содержание автореферата и публикаций автора полностью соответствуют содержанию диссертационной работы.

Замечания и пожелания по диссертационной работе.

1. Цели и задачи написаны неконкретно. Желательно писать без вводных словосочетаний (цель и задача 2);
2. Из текста диссертации непонятно, со сколькими образцами проводили все эксперименты. Так, например, в главе 2 «Материалы и методы исследований» (стр.51) указывается, что «В коллекционном питомнике изучались 19 гибридов и сортов кабачка и патиссона...», а дальше «Селекционный материал, состоящий из более 100 селекционных образцов...». В главе 3 Результаты и обсуждения приводятся данные по

одному этапу эксперимента (таблица 7 –Влияние холодной предобработки..) – 8 образцов, по другому этапу – 30 (таблица 9). Следовало бы эксперимент проводить на одинаковых образцах. Для лучшего восприятия информации следовало бы в главе 2 добавить подглаву – Объекты исследования, в которой были бы перечислены все образцы на каждом этапе исследования.

3. Соискателю следует дать пояснение, почему в пункте 2.2.2 концентрация стерилизующего вещества составляет 10% (стр. 55), а в пункте 2.3 (стр.59) и в экспериментальной части главы 3, пункт 3.3 (стр.82) –указана концентрация 5-15%.
4. Из текста диссертации неясно, по какому принципу составлялись варианты питательных сред для культивирования изолированных семян (стр.56). Какая питательная среда была взята за контроль на всех этапах исследования?
5. В тексте диссертации на страницах 56 и 86 повторяется информация по описанию состава питательных сред.
6. Название пункта 2.3 «Изучение влияния факторов на индукцию гиногенеза в культуре неопыленных семян кабачка и патиссона *in vitro*» больше подходит для экспериментальной части, нежели для описания методов исследования.
7. На стр.79 текста диссертации соискатель использует словосочетание «гаплоидный каллус». Следует автору уточнить, что он имел в виду.
8. В главе «Результаты и обсуждения», к сожалению, приводятся только одни результаты. Обсуждение полученных результатов приводится кратко.
9. Подписи к рисунку 10, название таблицы 13, 14 начинаются со слова «Изучение...», что некорректно для подписи к рисунку и названиям таблиц.
10. В таблице 8 (стр.87) приведен такой показатель, как «Индекс формы». Что это за показатель и как его рассчитывают?
11. В пункте 3.5 экспериментальной части работы приводятся результаты по влиянию концентрации сахарозы 2,4,6,8 %. Однако, автор делает вывод, что оптимальная концентрация сахарозы «около 30 г/л». На основании чего был сделан такой вывод?
12. Известно, что препарат 2,4-Д в концентрации 2 мг/л в культуре *in vitro* оказывает непосредственное влияние на формирование каллусной ткани. В результате полученных данных автор утверждает, что данный вариант оказался более эффективным для получения большинства эмбрионов. Хотелось бы узнать- эти эмбрионы формировались из каллуса или путем прямого эмбриогенеза? Анализ плоидности проводили на каких растениях-регенерантах, полученных из каллуса?
13. На странице 103 соискатель в своих обсуждениях пишет «Из литературы известно...», «В литературе по оценке..», но, к сожалению, не приводит ссылки на эти литературные источники.
14. Из текста диссертации неясно, учитывал ли соискатель такой фактор, как способ выращивания донорных растений (выращивание в теплице, открытом грунте) на частоту эмбриогенеза *in vitro*?
15. В тексте встречаются орфографические и грамматические ошибки. Также следует обратить внимание на оформление рисунков и таблиц (стр.102, 109,110).

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

Заключение. Диссертационная работа Ермолаева Алексея Станиславовича на тему: «Создание линий желтоплодного кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) с использованием биотехнологических и классических методов селекции», представляет собой законченную научно-квалификационную исследовательскую работу. Новые научные результаты, полученные диссертантом, имеют значение для российской науки и представляют большой практический интерес для селекционеров, работающих в области селекции тыквенных культур. Работа соответствует критериям предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям, установленным п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.), а ее автор Ермолаев Алексей Станиславович заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Официальный оппонент:

Профессор кафедры биотехнологии
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Российский
государственный аграрный
университет – МСХА имени К.А.

Тимирязева»

(ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А.

Тимирязева),

доктор биологических наук

(03.00.23 – Биотехнология, 2004), профессор

Калашникова Елена Анатольевна



Руководитель службы кадровой
политики и приема персонала

E. A. Kalashnikova

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, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49, Тел. +7 (499) 976-40-72, E-mail: ekalashnikova@rgau-msha.ru