

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии»
(ФГБНУ ВНИИСБ)**

127550, г. Москва
ул. Тимирязевская, д. 42

тел. 8-499-976-65-44, факс 8-499-977-09-47
e-mail: iab@iab.ac.ru

25.10.2023 № 16-1/197

на № _____

УТВЕРЖДАЮ

ИО Директора Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»
доктор биологических наук, профессор,
академик РАН

Г.И. Карлов



«25» октября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» 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, созданном на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «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 диссертационного исследования. Сельское хозяйство – это основа продовольственной безопасности любой страны мира и наряду с производством в стране зерна, производство овощей является важным фактором обеспечения продовольственной безопасности, так как овощи необходимы в структуре питания населения. В распоряжении Правительства РФ «Об утверждении перечня показателей в сфере обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации» от 10 февраля 2021 г. N 296-р овощи стоят на третьем месте. В повышении эффективности овощеводства большая роль отводится селекции, на которую возложена задача создания новых сортов и гибридов. Все звенья селекционного процесса взаимосвязаны, объединены в единую систему и включают подбор, изучение и создание исходного материала на основе применения инновационных методов изменения наследственности с целью расширения формообразовательного процесса и отбора принципиально новых источников и доноров с комплексом хозяйственно ценных признаков. Выполнение всех этапов селекционного процесса требует больших затрат средств и времени.

Кабачки и патиссоны, относящиеся к виду *Cucurbita pepo* L. распространены почти во всех регионах с умеренным и субтропическим климатом и являются очень востребованными овощными культурами у потребителей. Незрелые плоды этих культур представляют собой высокоценный продукт питания, характеризующийся высоким содержанием сухого вещества, витаминов и минералов. Их выращивают в теплицах, на приусадебных участках, на полях и производят традиционным и органическим способом. Вид *C. pepo* характеризуется огромным разнообразием и представленные на рынке сорта крайне разнообразны по форме и окраске. Сорта с желтой окраской коры и оранжевой мякотью богаты каротиноидами, очень востребованы у производителей, но пока представлены на отечественном рынке преимущественно иностранными гибридами.

Процесс создания высокопроизводительных сортов и гибридов крайне сложен и долговремен. Так, для создания сорта кабачка классическим методом, необходимо проводить самоопыление до получения высокой гомозиготности, что обычно занимает от 6 до 10 лет. Широко востребованные у производителей овощной продукции гетерозисные гибриды F_1 представляют собой стабильные, но гетерозиготные формы, которые создают путем подбора и гибридизации инбредных родительских линий. Длительное время создания гомозиготной линии (5-7 поколений инбридинга) является одной из основных проблем селекции гибридов F_1 . Использование биотехнологических подходов, а именно культуры неопыленных семяпочек *in vitro* для кабачка и патиссона является одной из перспективных гаплоидных технологий, позволяющих добиться полной гомозиготности за одно поколение, что существенно сокращает временные затраты. Удвоенные гаплоиды будут представлять интерес не только для селекционной работы, но и как перспективный материал для генетических исследований, упрощения секвенирования генома, создания картирующих популяций. Внедрение гаплоидных технологий в селекционный процесс будет способствовать построению уникальных селекционных схем и быстрому созданию сортов и гибридов нового поколения, отвечающих требованиям рынка. Особый интерес представляет получение полиплоидных гомозиготных линий и использование их в скрещиваниях для создания триплоидных бессемянных гибридов кабачка, поскольку в настоящий момент, об этой технологии еще ничего не известно.

В литературе имеется лишь ограниченное количество универсальных протоколов для получения удвоенных гаплоидов кабачка в культуре изолированных семяпочек *in vitro* и в большинстве случаев отмечается их генотипспецифичность, а для патиссона они отсутствуют. Поиск способов оптимизации технологии с целью увеличения ее эффективности и увеличения количества индуцированных гиногенных семяпочек у различных генотипов, введенных в культуру *in vitro*, повышения частоты регенерации

полученных эмбриоидов и каллуса, выхода удвоенных гаплоидов, оптимизация методик оценки полученных растений-регенерантов на уровень плоидности и гомозиготности – все это представляет собой ряд нерешенных задач для овощных культур *C. pepo*.

Проводимые исследования в области создания перспективного селекционного материала кабачка и патиссона с использованием как классических, так и биотехнологических методов, позволят выявить важные закономерности для эффективного производства выровненного линейного материала, обладающего комплексом хозяйственно-ценных признаков, в связи с чем, выбранная тема диссертационной работы Ермолаева А.С. «Создание линий желтоплодного кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) с использованием биотехнологических и классических методов селекции» представляется актуальной.

Научная новизна. В результате проделанной работы впервые в России, с использованием биотехнологических методов получены гиногенные линии кабачка и патиссона разного уровня плоидности, проведена оценка по комплексу хозяйственно ценных признаков, с целью их дальнейшего включения в селекционный процесс. Полученное в культуре неопыленных семяпочек кабачка и патиссона потомство было протестировано с использованием микросателлитных (SSR) маркеров и была показана эффективность использования этого типа молекулярных маркеров для подтверждения гиногенного происхождения полученных растений - регенрантов (истинных ДН-растений) и отделения растений, полученных в результате деления соматических клеток (микроклоны).

Впервые удалось получить потомство от опыления между диплоидными и тетраплоидными гиногенными линиям и получить триплоидные гибриды кабачка.

Впервые 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 пloidности. Были также получены микрофотографии хромосом кабачка и патиссона у растений разного уровня пloidности, которые будут представлять интерес для других исследователей, работающих с данными культурами.

Теоретическая и практическая значимость. Было проведено усовершенствование элементов технологии получения ДН растений в культуре неопыленных семяпочек *in vitro*, позволяющее получать до 55 эмбриоидов на одну культивируемую завязь, что превосходит по эффективности технологии, отраженные в литературных источниках для вида *C. pepo*. В результате оптимизации этапа стерилизации для получения эксплантов со 100 % отсутствием контаминации и без потери эмбриогенного потенциала семяпочек кабачка и патиссона был предложен более быстрый способ, позволяющий сократить время с 50 минут (при использовании стандартной ступенчатой стерилизацией с 5% гипохлоритом натрия) до 1 минуты при краткосрочном обжигании завязи в 96% спирте. Были разработаны эффективные протоколы оценки уровня пloidности 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 семяпочек *in vitro*. Из полученных гиногенных растений патиссона в условиях провокационного инфекционного фона выделены ДН - растения, с насыщенно желтыми плодами, преимущественно женского типа 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.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов исследований, выводов и рекомендаций подтверждается проведенным автором анализом значительного количества источников отечественной и зарубежной литературы; применением современных методов статистической обработки данных в научных исследованиях; методологической обоснованностью при планировании опытов; согласованностью технических результатов с экспериментальными данными; апробации результатов на научно-практических конференциях, в том числе с международным участием.

Диссертантом выполнен необходимый объем экспериментов и исследований и систематизирован полученный научный материал. Основные результаты исследований опубликованы в шести печатных работах, в том числе трех - в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации. Текст диссертации построен по традиционному плану и 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 семи приложений. Список литературы содержит 189 источник, из них – 154 иностранных авторов.

Во введении обоснована актуальность темы исследования и показана степень проработки проблемы; сформулированы цель и задачи исследований; научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, их достоверность, апробация работы и личный вклад соискателя; представлены методология и методы исследований; представлены результаты публикаций материалов диссертации в различных научных изданиях, в том числе входящих в списки Scopus и Web of Science и в перечень ВАК РФ; представлена структура и объем диссертации.

В главе 1 представлен всесторонний обзор отечественных и зарубежных литературных источников о современном состоянии селекции

кабачка и патиссона и разработанных протоколов, применяемых в области получения удвоенных гаплоидов у *C. pepo*. Обзор литературы изложен достаточно квалифицированно. На основании проведенного анализа была сформулирована цель, составлены задачи и разработана программа исследований диссертации.

В главе 2 приведена методика лабораторных и полевых опытов. Достаточно подробно изложены: изоляция семян и введение в культуру *in vitro*; адаптация к условиям *ex vitro* и выращивание растений-регенерантов; описание экспериментов по изучению влияния факторов на индукцию гиногенеза в культуре неопыленных семян кабачка и патиссона *in vitro*; проведение самоопылений растений-регенерантов R₀ и R₁ и получение семенного потомства; идентификация плоидности растений-регенерантов на основе морфометрических параметров эпидермиса с абаксиальной стороны листа; исследование плоидности растений с использованием проточной цитометрии клеточных ядер; пропионо-лакмоидный метод окраски хромосом; выделение ДНК и проведение SSR-анализа.

В главе 3 представлены результаты изучения образцов кабачка и патиссона в коллекционном и гибридном питомниках. Проведена оценка, в результате которой в качестве ген источников скороспелости для кабачка были выделены 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. Для патиссона в качестве ген источников скороспелости выделились: сорт Диск, Чебурашка и F1 Sunny Delight. Весь изученный материал показал возможность использования его в качестве ген источников по форме плода и толщине мякоти. По признаку оранжевой окраски коры были выделены образцы: F1 Sunny Delight, Копейка, НЛО оранжевый, F1 Солнечный зайчик. Используя методы классической селекции, лучшими линейными формами кабачка, с оранжевой окраской плодов, цилиндрической формой плода со сбегом к плодоножке, без ребер были получены: I₄ Ясмин 21/194, с толщиной

мякоти 2,5-3 см и I₄ Святозар 21/221 с толщиной мякоти 2,5 см. По срокам цветения женскими цветками была выделена линия кабачка I₄ Святозар 21/221, у которой цветение женскими цветками начиналось через 36 суток. После проведения иммунологической оценки линии кабачка I₅ Святозар (22/E9) и I₅ Святозар (22/E10) показали наибольшую толерантность к патогенам мучнистой росы.

В главе 3 также были 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. Большая работа была проведена, и в диссертационном исследовании представлены данные по оценке полученных в культуре *in vitro* растений - регенерантов на уровень ploидности с использованием трех различных методов. Среди адаптированных к условиям *ex vitro* гиногенных растений *C. pepo* было отмечено: диплоидов – 32,35%, триплоидов – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоиды (n) были обнаружены только среди растений в культуре *in vitro*. В результате оптимизации протокола проточной цитометрии клеточных ядер и проведенной оценки было установлено два цитотипа для диплоидных образцов *C. pepo* с содержанием ДНК 2С = 1,07 ± 0,03 пг для образцов кабачка, относящихся к *subsp. pepo*, и второй цитотип 2С = 0,95 ± 0,03 пг для образцов патиссона, относящихся к *subsp. ovifera*.

В результате проведенных наблюдений с использованием электронного микроскопа были получены изображения пыльцевых зерен кабачка и патиссона разного уровня ploидности.

Представлены результаты оценки растений – регенерантов кабачка с использованием SSR маркеров, показавшие, что более 70 % из проанализированных образцов были гомозиготными, что подтверждало их гиногенное происхождение.

В диссертационном исследовании в главе 3 также была продемонстрирована технология создания бессемянных плодов кабачка на основе проведенных скрещиваний между диплоидными и тетраплоидными линиями, полученными в культуре изолированных семян *in vitro*.

В **заклучении** диссертант подвел итоги экспериментального исследования, представленные в виде девяти конкретных выводов, сформулированных в логической последовательности по основным защищаемым положениям.

Автореферат в полной мере отражает основные результаты диссертационного исследования.

Степень обоснованности и достоверности выводов и результатов, а также личный вклад соискателя. В целом, представленная диссертация является завершенной научно-квалификационной работой. Рассматривая представленный в работе большой экспериментальный материал, детальный и всесторонний анализ ранее проведенных по соответствующей тематике работ, можно отметить, что выдвигаемые на защиту положения имеют достаточную обоснованность. Исследования проводились с применением апробированных современных методик, стандартных методов математической статистики. Работа хорошо иллюстрирована. Выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, достаточно полно изложены и научно обоснованы, и вытекают из проведенных исследований. Соискателем разработана программа исследования, получены основополагающие данные, проведено теоретическое обобщение полученных результатов, подготовлены и опубликованы в соавторстве научные публикации. Таким образом, достоверность и обоснованность полученных результатов не вызывает сомнений.

Апробация работы. 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.

Замечания и пожелания по диссертационной работе:

1. В выводе 9 говорится о линейных формах кабачка (I₄ Ясмин 21/194, I₄ Святозар 21/221, I₅ Святозар (22/E9) и I₅ Святозар (22/E10)), созданных с использованием традиционных методов селекции, однако в таблице 1, где приводится список изученных в диссертационном исследовании сортов и гибридов кабачка и патиссона, находящихся в коллекционном питомнике образцы Ясмин и Святозар не указаны. Чем объясняется их отсутствие в коллекционном питомнике.

2. В Приложении Е, где приводится разработанная модель сорта для кабачка и патиссона представлены биохимические показатели (содержание сухого вещества для кабачка 4-8%, патиссона 4-6 %), однако в диссертационном исследовании данные по биохимическому анализу не приведены. Проводился ли биохимический анализ выделенных линий?

3. В разделе 3.6 «Изучение эмбриогенеза в культуре неопыленных семязпочек *in vitro*» данные по эмбриогенезу кабачка и патиссона представлены недостаточно полно, нет описания изученных этапов эмбриогенеза, не приведены количественные данные по изменению размеров семязпочек.

4. В выводе 3 указывается «Среди адаптированных к условиям *ex vitro* гиногенных растений – регенерантов *S. perov* было отмечено: диплоидов – 32,35%, триплоидов – 26,47%, тетраплоидов – 33,82%, октаплоидов – 4,41%, анеуплоидов – 2,94%. Гаплоиды (n) были обнаружены только среди растений

в культуре *in vitro*», то есть приводится среднее значение для всех полученных растений в культуре неопыленных семян *in vitro*, наблюдались ли различия по соотношению диагностированного уровня ploидности между гиногенными растениями-регенерантами кабачка и патиссона?

5. На рисунке 9 представлена схема гибридных скрещиваний для получения бессемянного триплоидного ($3n$) кабачка. Проводились ли подобные работы на растениях патиссона?

6. В диссертации встречается ряд технических ошибок в виде опечаток и стилистических ошибок.

Заключение по диссертационной работе. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки). Автореферат и научные публикации соответствуют содержанию диссертации. Высказанные замечания и пожелания не имеют принципиального значения и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Диссертация 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, которая по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, большому объему выполненной работы, научной новизне и практической значимости соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям, установленным п. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 в редакции постановления Правительства РФ №1539 от 11.09.2021), а ее автор А.С. Ермолаев заслуживает присуждения ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 4.1.2. Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные науки).

Отзыв на диссертационную работу Ермолаева Алексея Станиславовича на тему: «Создание линий желтоплодного кабачка и патиссона (*Cucurbita pepo* L.) с использованием биотехнологических и классических методов селекции», рассмотрен и одобрен на расширенном заседании отдела клеточной и геномной инженерии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» протокол № 2 от 16 октября 2023 г.

Научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), доктор биологических наук, профессор, академик РАН, специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство сельскохозяйственных растений

Петр Николаевич Харченко



Подпись

Закрываю:

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ

Харченко
Петра Николаевича

Е.М. Федина

25 октября 2023 г.

127550, Москва, Тимирязевская, 42, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), телефон +7 (499) 976-65-44; факс +7 (499) 977-09-47, e-mail: iab@iab.ac.ru