

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Тевфик Арзы Шевкиевны «Индукция морфогенеза *in vitro* и регенерация растений в культуре вегетативных почек и зародышей канны садовой (*Canna × hybrida hort ex Backer*)» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.01 – ботаника и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность избранной темы исследования

В течение последних двух десятилетий количество исследований по клональному микроразмножению редких и полезных растений растет экспоненциально. Это связано с тем, что биотехнология не только решает задачи сохранения биоразнообразия растений, дополняя существующие традиционные методы сохранения современными инструментами, но и обеспечивает возможность эффективного и устойчивого управления генетическими ресурсами.

Представленная работа посвящена разработке биотехнологических приемов микроразмножения и сохранения перспективных сортов канны садовой из ценнейшей коллекции канн Никитского ботанического сада, включающей 55 сортообразца, в том числе 6 - природных видов, 26 сортов селекции НБС-ННЦ и 23 сорта зарубежной селекции. Если для представителей рода *Canna indica* L. и *Canna edulis* Ker. разработаны и усовершенствованы этапы клонального микроразмножения, то для сортов *C. hybrida* ранее использовались только традиционные методы размножения. Автором впервые поставлена задача разработки протоколов микроразмножения *C. hybrida* на основе анализа путей морфогенеза *in vitro*.

Актуальность исследований, проведенных А.Ш. Тевфик позволяющих разработать биотехнологию получения в сжатые сроки высококачественного оздоровленного материала, необходимого для селекционных работ и сохранения *ex situ*, включая генобанк *in vitro* и «живые» коллекции, не вызывает сомнений.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций

обеспечена большим объемом экспериментального материала, полученного с помощью современных методов исследований (культуры органов и тканей растений, эмбриокультуры, методов световой и поляризационной микроскопии, методов морфо-анатомического и физиологического анализа растительного материала, методов депонирования культур *in vitro*) в соответствие с поставленными целью и задачами исследования. Достоверность данных, представленные в работе, подтверждена с помощью методов математической статистики.

Научная новизна работы

Научная новизна диссертационного исследования определяется тем, что автором впервые проанализированы пути морфогенеза *in vitro* при использовании различных типов эксплантов 4-х перспективных сортов канны отечественной и зарубежной селекции. Выявлены морфогенетические потенции органов и тканей в культуре ткани. Установлено влияние физических и гормональных факторов на отдельные этапы регенерации растений из вегетативных почек и зиготических зародышей. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста (БАП, ТДЗ, НУК, ИУК), индуцирующие процесс прямого и непрямого органогенеза *in vitro*. Показаны структурные и функциональные изменения растений канны садовой *in vitro* по сравнению с *in vivo*. Выявлен сорт канны садовой ('Ливадия'), который обладает лабильным водным режимом и наибольшей адаптационной способностью к изменяющимся условиям культивирования. Определены оптимальный тип и концентрации ретардантов для депонирования двух сортов.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 разделов, выводов, практических рекомендаций, приложения, включает 29 таблиц и 48 рисунков, приложение, список использованной литературы (350 наименований, в том числе – 255 иностранных авторов).

Во введении диссертант обосновывает актуальность исследований, ставит цель и задачи исследования, анализирует научную новизну и значимость своей работы, декларирует свой личный вклад и приводит основные положения, выносимые на защиту. Замечание по цели – исследуются особенности регенерации не самих эксплантов, а структур, формирующихся *de novo*. По пятой задаче, - «подобрать условия адаптации *in vivo* регенерантов канны садовой» – возник вопрос по терминологии: в литературе, чаще используется термин «адаптация *ex vitro*». Автор не совсем корректно использует в работе и другой термин - сохранение *in situ*, что означает «поддержание и восстановление жизнеспособных популяций и экосистем в естественных местообитаниях (UNCED, 1992)». В представленной работе использована «живая» коллекция канны садовой, следовательно, речь идет о сохранении биоразнообразия *ex situ* (Engelmann, Engels, 2002).

Следует отметить, что защищаемые положения изложены нетрадиционно. Соискатель их представляет в виде разделов работы, которые предполагает защищать, но не совсем ясно, что нового конкретно предлагается по каждому пункту.

Обзор литературы (Раздел 1) дает представление о состоянии исследований в области изучения особенностей микроразмножения декоративных культур порядка Zingiberales. Автором показано влияние трофических, гормональных и физических

факторов на морфогенез растений *in vitro*, представлены литературные данные по депонированию видов и сортов ценных многолетних культур. На наш взгляд, именно в этом разделе стоило подробно остановиться на определении термина меристемойды, используемого в работе, поскольку в обзоре обсуждаются пути морфогенеза *in vitro*. Согласно определению Т. А. Thorpe (1978, 1982), автора классических работ по органогенезу *in vitro*, «меристемойды – это скопление меристемо-подобных клеток (т.е. мелких, изодиаметрических, тонкостенных, микро-вакуолизированных клеток с плотно окрашенным ядром и цитоплазмой). В представленной работе в Разделе 4 (стр. 67) приводится подобное определение, но в работе используется другая трактовка термина, а именно, вслед за Т. Sakai, К. Imai, (2007), меристемойды определяются как протокормоподобные структуры. Это вносит определенную путаницу, так как первое определение – устоявшееся, общепринятое, а второе – используется лишь в некоторых работах.

В разделе 2 «Материалы и методы исследований» приводится подробная характеристика объектов исследования – перспективных сортов канны садовой из коллекционных насаждений НБС ННЦ. Детально обсуждаются методики исследования на всех этапах работы, начиная со стерилизации эксплантов и заканчивая адаптацией культур. В целом, представленное исследование проведено с использованием разнообразных методик, которые позволили на современном уровне достичь цели и решить задачи диссертационной работы.

Результаты исследований и их обсуждение изложены в разделах 3-8. **В 3 разделе** изучены основные факторы, влияющие на индукцию морфогенетических процессов *C. hybrida in vitro*. Разработаны протоколы стерилизации вегетативных почек и семян, показано, что на регенерацию микропобегов из первичных эксплантов сортов канны *in vitro* оказывают влияние ряд факторов: тип экспланта, генотип растения, режим стерилизации и сроки отбора растительного материала.

В 4 разделе автор приводит данные по изучению морфогенетических потенций органов и тканей канны на разных этапах клонального микроразмножения.

Показано влияние типа и концентраций регуляторов роста на регенерационный потенциал эксплантов канны садовой. Установлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов ‘Дар Востока’ и ‘Суевия’ необходимо добавление в питательную среду 1,27 мг/л ТДЗ, для ‘Ливадии’ – 1,91 мг/л ТДЗ.

Проведенный гистологический анализ выявил, что у сортов ‘Суевия’ и ‘Ливадия’ в условиях *in vitro* морфогенетический потенциал реализуется через этап формирования

меристематидов в основании микропобегов. Значительно увеличить коэффициент размножения исследуемых сортов автору удалось за счет длительного культивирования, что привело к индукции процесса прямого органогенеза и массового образования меристематидов и меристематидных кластеров. В работе использован регулятор роста ТДЗ, обладающий цитокининовой активностью, который при длительном использовании у многих культур вызывает аномалии развития. Возникает вопрос: наблюдали ли подобные эффекты при культивировании канны?

Благодаря использованию метода эмбриокультуры автору удалось получить полноценные растения сортов 'Дар Востока' и 'Ливадия' (от свободного опыления), используя предварительную стратификацию в течение 60 сут на среде Монье.

Замечания по разделу: табл. 4.2 (стр. 66) по влиянию регуляторов роста на образование адвентивных микропобегов не содержит графы «количество побегов, шт./эксплант», хотя цифры приведены, но в других графах. Тот же недочет и в табл. 4.5 (стр. 76). На рис. 4.4. отсутствуют стрелки или обозначения структур на фотографиях, которые бы разъясняли, что автор имеет в виду. В автореферате в подписях к этому же рисунку (рис. 2, стр. 11) допущена ошибка, подписи А) и Б) переставлены местами. С точки зрения хронологической последовательности морфогенетических событий первой должна быть размещена фотография образующихся меристематидов, а затем – закладка листовых примордиев.

В 5 разделе представлены результаты по укоренению микропобегов *in vitro* и адаптации регенерантов к условиям *ex vitro*. Благодаря спонтанному ризогенезу *in vitro* на некоторых средах, используемых для адвентивного побегообразования, этап укоренения не разрабатывался. Возникает вопрос: насколько было целесообразно продолжать культивирование до 3-х месяцев на индукционных средах, содержащих цитокинины, и не переводить микроклоны на среды с ауксинами, стимулирующими ризогенез?

Далее автор представляет данные по адаптации микроклонов к условиям *ex vitro*, испытывая различные типы субстратов. Самая высокая частота адаптации растений регенерантов была получена при высаживании их в субстрат, состоящий из перлита, стерильного почвенного субстрата (1:1) и при поддержании 100% влажности воздуха (первые 2-3 недели). У сорта канны 'Суевия' было получено наибольшее количество адаптированных растений (до 75%). В выводе 8, результирующему эти данные, пропущено название сорта 'Суевия'.

Материалы, представленные в 6 разделе, посвящены морфологическим и физиологическим исследованиям регенерантов некоторых сортов канны садовой в условиях *in vitro* и при адаптации к условиям внешней среды. Следует отметить, что

подобные физиологические исследования редки в российских работах, хотя, безусловно, представляют большой интерес. Автору удалось наглядно продемонстрировать структурные изменения листа при культивировании *in vitro*, а также проанализировать параметры водного режима и фотосинтетической активности канны садовой. В результате выделены информативные структурные индикаторы адаптивности и устойчивости к воздействию стрессовых факторов, к которым относятся толщина листовой пластины, степень дифференциации мезофилла, толщина покровных тканей и распределение устьиц. Из представленного сортимента автор выделил сорт 'Ливадия' как имеющей большой потенциал к реализации пластичности при адаптации.

В последующем **7 разделе** по депонированию культур подобраны режимы для замедления роста вегетативных почек и меристематических тканей изучаемых сортов с использованием $\frac{1}{2}$ МС, дополненной оптимальными концентрациями ретарданта (CCC), высокой концентрацией сахарозы в условиях пониженной температуры и низкой освещенности. Разработанные режимы позволяют сохранять ценные сорта в генобанке без пересадок в течение 7 месяцев.

Завершает работу **8 раздел**, представляющий, по сути, заключение, в котором автор обсуждает полученные результаты с привлечением литературных данных, что, безусловно, способствует лучшему восприятию объемной работы как целостного исследования. Этому же способствуют и информативные схемы «Биотехнологические этапы клонального микроразмножения растений канны садовой через культуру вегетативных почек» и «Биотехнологические этапы получения селекционных форм канны садовой», представленные в диссертации. В автореферате дана общая схема по клональному микроразмножению канны садовой, в которой, к сожалению, допущена неточность в пункте «регенерация меристематических тканей», в диссертации указано правильно - «регенерация микропобегов из меристематических тканей».

В диссертационной работе и в автореферате имеется ряд досадных опечаток, стилистических погрешностей, неточностей в нумерации таблиц (автореферат). Однако, в целом, все высказанные замечания, в том числе, и терминологического плана, не умаляют общего хорошего впечатления от диссертационной работы Арзы Шевкиевны.

Автором проделан большой объем исследовательской работы с привлечением современных методов исследования, полученные материалы хорошо представлены и иллюстрированы множеством фотографий. Основные результаты содержатся в 11 выводах, соответствующих поставленным задачам.

Содержание работы отражено в 17 публикациях, в том числе 8 статьях в журналах, рекомендованных ВАК и автореферате. Материалы апробированы на многих региональных, Всероссийских и международных конференциях, симпозиумах, съездах.

Заключение.

Диссертационная работа Арзы Шевкиевны «Индукция морфогенеза *in vitro* и регенерация растений в культуре вегетативных почек и зародышей канны садовой (*Сanna × hybrida hort ex Backer*)» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение одной из важнейших задач ботаники, а именно, сохранении перспективных генотипов растений с помощью биотехнологических подходов.

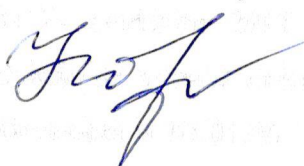
По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований их практической значимости представленная диссертация соответствует требованиям ВАК предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно пп. 9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней ...», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842, а ее автор, Арзы Шевкиевна Тевфик, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.01 – ботаника и 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующая лабораторией биотехнологии

Федерального государственного бюджетного
учреждения науки

Центрального Сибирского ботанического сада СО РАН,

доктор биологических наук



Новикова Татьяна Ивановна

<http://www.csbg.nsc.ru>

ул. Золотодолинская, 101

630090, г. Новосибирск

Тел.: +7(383) 3399825

Факс: +7(383) 3301986

Email: tin27@mail.ru

8.06.2012

Подпись	<i>Новикова Т.И.</i>
ЗАВЕРЯЮ	
Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центрального сибирского ботанического сада Сибирского отделения Российской академии наук	
д.б.н., с.н.с.	<i>Байкова</i> Е.В. Байкова
« 8 » июня 2012 г.	

