

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский
государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»

А.А. Короновский
2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации по диссертации Тевфик Арзы Шевкиевны
«ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА IN VITRO И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В
КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ ПОЧЕК И ЗАРОДЫШЕЙ КАННЫ
САДОВОЙ (*CANNA* x *HYBRIDA* HORT EX BACKER)»,
представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальностям
03.02.01 – «Ботаника» и 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)»

Биотехнологические приёмы уже сравнительно давно стали надёжным подспорьем в решении целого ряда проблем прикладной ботаники, таких как производство различных веществ вторичного метаболизма растений, сохранение биоразнообразия in vitro, массового производства посадочного материала трудно размножаемых видов и форм, освобождения растительного материала от патогенов, воспроизводство в ряду поколений продуктов отдалённой гибридизации и т.п. Но до последнего времени не снижается актуальность проводимых исследований по разработке и оптимизации биотехнологических методов, в частности, из-за того, что каждый растительный объект (вид, сорт, порода или гибридная комбинация) требуют индивидуального подхода и, вероятно, невозможно выработать абсолютно универсальный алгоритм использования тех или иных биотехнологических методов для различных объектов.

Не исключением в этом отношении является и *Canna x hybrida hort. ex Backer*, для многих гибридов которой проблемными остаются вопросы воспроизводства в ряду поколений без расщепления, оздоровления посадочного материала и т.п. В связи с этим диссертационная работа А.Ш. Тевфик, посвященная исследованию путей морфогенеза и особенностей регенерации различных эксплантов *in vitro* с целью разработки приёмов микроразмножения и сохранения трёх перспективных сортов канны садовой, актуальна и отвечает всем требованиям современной науки и практики.

Важным является тот факт, что данная обширная и многосторонняя работа сделана впервые на канне садовой.

Диссертация изложена на 177 страницах, состоит из введения, 8-и разделов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и 5-и приложений. Работа подробно иллюстрирована, включает 29 таблиц и 52 рисунка.

Во **Введении** А.Ш. Тевфик даёт общую характеристику темы исследования, её актуальности, формулирует цель и задачи. Соискателем сформулировано 8 задач, часть из которых представляется излишне раздробленными. Так, например, задачи 2 - 4 вполне логично можно бы было представить одной, т.к. «особенности роста и развития различных эксплантов» включают в себя и «влияние биотических и абиотических факторов на разных этапах морфогенеза», и «возможности и пути дифференциации различных органов и тканей *in vitro*». Сформулированные положения, выносимые на защиту, на наш взгляд, констатируют выявленные закономерности или особенности, которые в работе, безусловно, установлены.

Обзор литературы (**Раздел 1**), посвящённый подробному анализу результатов исследований представителей порядка Zingiberales по каждому этапу клонального микроразмножения (подготовка эксплантов, регуляция морфогенеза, пути морфогенеза, роль отдельных факторов на эффективность микроразмножения, условия депонирования, особенности адаптации к

нестерильным условиям среды). Безусловной заслугой соискателя является впечатляющий объём проанализированной литературы, причём большей частью зарубежной.

Следует отметить, что в подразделах 1.2 – 1.6 не всегда выдерживается логическая последовательность анализа. Например, в подразделе 1.2 при анализе роли генотипа и типа первичного экспланта анализируются литературные данные по представителям пор. Имберецветные - последовательно по имбирю, маранте, геликонии, стрелеции, банану, затем опять по имбирю и опять по банану, а в конце подраздела почему-то приведён анализ результатов исследований по пиону, относящемуся совсем к другому пор. *Raeoniales* (стр. 14-16). То же самое касается и подраздела 1.5. Нельзя не отметить отдельные неточности с использованием латинских и русских названий. Так, например, на стр. 21 и 22 порядок *Zingiberales* назван семейством, а на стр. 23 *Iris nigricans* приводится как латинское название имбиря.

На основе анализа литературных источников, диссертант оправданно делает вывод о недостаточности изученности возможностей клонального микроразмножения канны садовой, необходимости исследования морфогенетического потенциала различных эксплантов этого вида растений. Соискатель делает этот вывод в конце всего раздела и только в отношении работ по канне садовой при том, что эти работы составили лишь небольшую часть от общего числа проанализированных литературных источников по результатам исследования других видов растений. На наш взгляд, было бы более логичным и оправданным, если в конце каждого подраздела, либо в конце всего раздела, были сделаны выводы обобщающего характера по результатам проведённого анализа всех литературных источников по всем проанализированным видам растений и в отношении каждого этапа клонального микроразмножения. Так как не совсем понятно для чего был проведён столь обширный анализ литературных источников, если для сделанного в разделе заключения было достаточно провести анализ лишь

нескольких работ по клональному микроразмножению собственно канн. Отчасти обобщённые выводы по всей проанализированной литературе приводятся в начале 8-го раздела, посвящённого обсуждению полученных результатов, хотя, по нашему мнению, было бы желательно привести их в разделе 1.

В разделе 2 («Материал и методы») дана характеристика исходного материала, типов вводимых эксплантов, условий стерилизации и асептики. Далее приводятся методики индукции развития эксплантов и регенерации микропобегов, хемотерапии, гистологических исследований морфогенеза, индукции ризогенеза *in vitro* и адаптации *in vivo*, определения структурных характеристик, физиологических особенностей водного режима и фотосинтетической активности меристемоидов и регенерантов, депонирования эксплантов канн садовой *in vitro*, а также методика проращивания семян.

В целом, решение поставленных диссертантом задач проведено с использованием разнообразных методов, которые адекватны цели и задачам диссертационной работы.

В разделах 3-7 А.Ш. Тевфик излагает обширный фактический материал, который достаточно полно проиллюстрирован фотографиями, микрофотографиями, графиками различных типов и сведен в таблицы.

Раздел 3 посвящен исследованию основных факторов, влияющих на индукцию развития эксплантов изучаемых сортов в условиях *in vitro*. В начале главы анализируется влияние на реализацию морфогенетического потенциала типа экспланта. Установлено, что из всех использованных типов экспланта самым высоким морфогенетическим потенциалом обладают вегетативные почки и изолированные зародыши. Правда при этом в основном приводятся такие показатели, как длительность сохранения жизнеспособности или эффекта разрастания тканей эксплантов. Остаётся неясным на состав одной и той же среды или на разные среды осуществляли их введение.

Далее приводятся результаты экспериментов по разработке протокола стерилизации первичных эксплантов. Всего апробировано 4 схемы стерилизации, из которых две – для стерилизации вегетативных почек, 1 – для стерилизации листа и 1 – для стерилизации завязи и бутонов. Хотелось бы уточнить по какому принципу подбирали алгоритм стерилизации и почему выбраны для экспериментов именно эти схемы стерилизации, причём в отношении каждого типа экспланта специфичные. В работе приведены только оптимальные схемы, дающие максимальный эффект или это – единственные апробированные схемы стерилизации?

Автором диссертации в последнем подразделе раздела анализируется влияние срока отбора и генотипа на процесс регенерации микропобегов и делается вывод о том, что на регенерацию микропобегов оказывают влияние все из указанных факторов.

В разделе 4 приведены результаты изучения морфогенетических потенциалов органов и тканей исследуемых объектов на разных этапах клонального микроразмножения. Раздел начинается с изложения состава базовых сред, использованных в работе, что, по нашему мнению, логичнее было бы разместить их в соответствующем подразделе 2-го раздела.

Далее в работе приводится анализ влияния регуляторов роста на процесс регенерации побегов из вегетативных почек. Отслеживаются различные пути морфогенеза как ответная реакция на культивирование на средах различного состава (удлинение микропобегов, адвентивное побегообразование, образование меристемоидов и т.п.). Ярким подтверждением этого, являются результаты гистологического анализа.

При всей убедительности показанного наличия различий в реакции на разные регуляторы роста хотелось бы уточнить по какому принципу подбирались типы регуляторов роста, их сочетание и концентрации при использовании разного состава базовых сред. В работе приведен анализ отдельных апробированных сред с максимальным эффектом действия на морфогенез того или иного типа или все апробированные варианты сред? И

почему в одном из вариантов сред используется концентрация БАП 2.0 – 4.0 мг/л, в то время как во всех остальных вариантах концентрации всех регуляторов роста фиксированные? Возможно, что во всём этом диапазоне БАП эффект регенерации одинаков или есть какая-то другая логика указания для одного варианта среды данного диапазона? Несомненный интерес вызывают результаты длительного культивирования. Однако, хотелось бы уточнить о скольких пассажах идёт речь при указании сроков культивирования (до 150 суток)? Как нам кажется, необходимо уточнить периодичность пассирования и информацию о том, одинакова ли была длительность культивирования на протяжении каждого из пассажей.

В последующих подразделах данного раздела приводится анализ полученных результатов по выявлению морфогенетического потенциала различных типов эксплантов (незрелых и зрелых семян, изолированных зародышей, высечек листа, сегментов бутонов и завязи). Диссертант делает обоснованные выводы об особенностях морфогенеза у различных типов эксплантов в зависимости от концентрации регуляторов роста в среде, генотипов и продолжительности культивирования.

В разделе 5 А.Ш. Тевфик приводит результаты экспериментов по укоренению микропобегов *in vitro* и адаптации *in vivo* регенерантов к нестерильным условиям. Соискателем показано, что при использовании ряда вариантов сред удаётся исключить специальный этап укоренения микропобегов отдельных из использованных сортов канны садовой, так как ризогенез в этом случае имеет место на этапе собственно регенерации, что существенно сокращает затраты и повышает эффективность регенерации. Диссертантом подобран состав почвенной смеси и оптимальные условия культивирования при адаптации регенерантов к нестерильным условиям. Вывод о необходимости смены условий адаптации, заключающийся в снижении влажности воздуха подтверждает целый ряд успешных экспериментов по адаптации пробирочных растений у садовых культур. В случае использования двух типов субстрата для адаптации регенерантов

сорта 'Дар Востока', представленных в диссертации, на наш взгляд маловероятными являются различия между долей адаптированных растений на более эффективном, по мнению соискателя, субстрате (перлит : листовая земля) по сравнению с перлитом (рис 5.6).

В разделе 6 диссертантом проведён анализ результатов исследований некоторых морфо-анатомических и физиологических параметров регенерантов *in vitro* по сравнению с растениями, культивировавшимися в условиях *in vivo*. На примере растений сортов 'Ливадия' и 'Суевия' показаны сортоспецифические морфологические и структурные изменения, происходящие после перенесения регенерантов канны садовой в нестерильные условия оранжереи. Показано, что для листьев регенерантов при культивировании в условиях *in vitro* характерна гидроморфная структура, в то время как при культивировании в условиях оранжереи происходили структурные изменения, способствующие адаптации к водному стрессу. Хотелось бы уточнить, имел ли место в экспериментах контроль в виде растений, сформировавшихся при прорастании из семян или при вегетативном размножении *in vivo*. Интересно проследить насколько структура листовой пластинки у регенерантов *in vitro* отличается от таковой у нативных растений на тех же сроках культивирования *in vivo*. Данное пожелание касается и результатов, полученных при изучении параметров водного режима и фотосинтетической активности регенерантов. В то же время нельзя не отметить значимость выделенных информативных структурных индикаторов адаптивности и устойчивости к воздействию стрессовых факторов при культивировании *in vitro* и адаптации *in vivo*.

В разделе 7 приведены результаты депонирования адвентивных побегов и меристемоидов, образовавшихся в основании микропобегов трёх сортов канны. Диссертантом сделан вывод о возможности депонирования при низких позитивных температурах обоих типов эксплантов на протяжении, по крайней мере, 7 месяцев. Хотелось бы уточнить, почему в анализе именно депонированию меристемоидов уделено основное внимание,

если в самом начале раздела соискатель косвенно указывает на то, что одной из задач, решаемых при депонировании, является снижение вероятности соматоклональной изменчивости. При этом, если следовать определению, приведённому на стр. 67 «Меристемой – это локализованная **группа клеток каллуса**, ... дающая начало адвентивным (придаточным) побегам или корням» (Заид и др. 2008), т.е. в их генезисе есть стадия каллусогенеза, который как раз и способствует возникновению соматоклональной изменчивости. Может быть, уместно было дать, в соответствии с полученными результатами, уточненное понимание объёма термина «меристема»?

Раздел 8 посвящён анализу и обсуждению полученных соискателем результатов исследований. По сути это – заключение по диссертационной работе. В той или иной мере обсуждаемые в разделе аспекты нашли отражение в вышеприведённом анализе содержания предыдущих разделов диссертационной работы.

В конце этого раздела приведены биотехнологические схемы микроразмножения растений 3-х сортов канны садовой, разработанные по результатам проведённого исследования, с указанием сортоспецифичных особенностей для каждого этапа культивирования.

Основные результаты диссертации отражены в 11 выводах, убедительно свидетельствующих о том, что все поставленные в диссертации задачи исследования решены.

Список использованной литературы включает 350 работ, из которых 255 - зарубежных авторов.

Приложение включает 3 таблицы, 12 рисунков. Как нам кажется, в силу небольшого его объёма (9 стр.) и отсутствия в нём громоздких таблиц и рисунков можно было не размещать их в приложении, а поместить в основной текст диссертационной работы.

Дополнительно к замечаниям и пожеланиям, приведённым выше в ходе анализа отдельных разделов диссертационной работы, имеются ещё следующие:

1. Проведённый анализ литературных данных и результатов исследования не единообразен и изложен сложным языком, что затрудняет отслеживание логики экспериментов.

2. Имеются отдельные замечания к оформлению рукописи. Например, наличие грамматических и технических ошибок. В ряде случаев нарушена нумерация таблиц и рисунков. Так в тексте нет табл. 1; но две табл. обозначены как 4.1 (стр. 62 и 63); 2 рис. - как 4.5 (стр. 72 и 73); 2 рис. - как 4.10 (стр. 78 и 80); 2 рис. - как 5.5 (стр. 97 и 99). При использовании русского и латинского названия растений, следующих друг за другом, последнее не взято в круглые скобки (стр. 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22 и далее по тексту). На рис. 4.4 не обозначены приведённые в подписи структурные элементы. На рис. 5.5. нет нумерации фотографий, хотя в подписи к рис. она приведена. В тексте многократно используются ссылки на авторов с инициалами без года опубликования работы, а в конце того же предложения в круглых скобках повторяются эти же авторы без инициалов, но с годом опубликования работы.

В то же время указанные замечания отнюдь не умаляют научного значения диссертационной работы А.Ш. Тевфик, выполненной на высоком методическом уровне.

В целом, на основании анализа экспериментальных данных, изложенных в диссертации, в сравнении с мировой практикой аналогичных исследований, можно сделать вывод о том, что А.Ш. Тевфик проделала существенную работу на актуальную тему. Во многом полученные ею данные отличаются новизной. Обоснованность выводов и достоверность полученных результатов обеспечены достаточным объемом фактического

материала, в большинстве случаев обработанного с применением современных математических методов.

Изложенные в диссертационной работе результаты могут быть использованы на биологических факультетах ВУЗов при разработке спецкурсов по биотехнологии растений.

Автореферат включает все основные положения диссертации.

Результаты исследований А.Ш. Тевфик прошли достаточно широкую апробацию. Они были представлены на 11 научных мероприятиях, большей частью международного уровня. Материалы диссертации полно отражены в 17 публикациях, в том числе 8 статьях, опубликованных в журналах, включенных в перечень ВАК МОН РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени. Публикация всех 17 работ нами подтверждается.

Таким образом, диссертационная работа «Индукция морфогенеза *in vitro* и регенерация растений в культуре вегетативных почек и зародышей канны садовой (*Canna x hybrida hort. ex Backer*)» – это завершенное исследование на актуальную тему, представляющее несомненный научный интерес. Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач, имеющих существенное значение для разработки проблем прикладной ботаники в области биотехнологии, в частности, в области совершенствования и применения метода клонального микроразмножения цветковых растений. Рассматриваемая диссертация отвечает требованиям пунктов 9-11 Положения «О присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, а ее автор Тевфик Арзы Шевкиевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.01 – «Ботаника» и 03.01.06 – «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)».

Отзыв заслушан и утвержден на заседании отдела биологии и экологии растений учебно-научного центра «Ботанический сад» Федерального

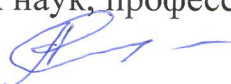
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» 27 мая 2016 г., протокол № 5.

Зав. отделом биологии и экологии растений,
кандидат биологических наук



Екатерина Владимировна Угольникова

Заместитель директора учебно-научного
центра «Ботанический сад» по научной работе,
доктор биологических наук, профессор



Александр Степанович Кашин

Подписи Екатерины Владимировны Угольниковой
и Александра Степановича Кашина
УДОСТОВЕРЯЮ

Ученый секретарь СГУ им. Н.Г. Чернышевского
доцент, к.х.н.



И.В. Федусенко

Почтовый адрес: ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского»,
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д.83
Телефон: 8-927-22-93-382
Электронный адрес: kashinas2@yandex.ru