

115  
03 Октября 2016

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Мурасевой Динары Серыкбаевны

«РАЗМНОЖЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO* РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ

РОДА *FRITILLARIA* L.»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности

03.02.01 – «Ботаника»

Проблемы сохранения биологического разнообразия и рационального использования биоресурсов относятся к числу глобальных вопросов в мире и являются приоритетными в экологической политике России. Диссертационная работа Мурасевой Динары Серыкбаевны посвящена изучению регенерационного потенциала различных типов эксплантов в условиях культуры *in vitro*, выявлению путей морфогенеза и разработке биотехнологий ускоренного размножения и сохранения *in vitro* некоторых редких исчезающих, хозяйственно-ценных растений из рода *Fritillaria*.

Микроклональное размножение широко используется для массового производства ценных образцов и генотипов различных видов растений. Известны данные и по некоторым видам рода рябчик. Однако для большинства видов этого рода технологии микроразмножения не разработаны. Ведущие ботаники нашей страны считают, что для России вопросы охраны и сохранения должны решаться в первую очередь для эндемичных видов и видов, имеющих на территории России очень маленький ареал (Варлыгина, 2011). В связи с этим особый интерес представляют представители рода *Fritillaria*, произрастающие в Южной Сибири, которые являются редкими и эндемичными видами флоры России. Большинство из них, относятся к категории редких и исчезающих видов растений, занесенных в Красную Книгу Российской Федерации (2008). Они имеют преимущественно семенной способ размножения и характеризуются наличием особых механизмов, затрудняющих прорастание семян. В первую очередь это покой семян, возникающий вследствие различных причин, как то механическое сопротивление покровов семени росту зародыша, недоразвитие зародыша на момент диссеминации, механизм физиологического торможения прорастания и др. Виды рода рябчик характеризуются длительным виргинильным периодом, от прорастания семени до цветения проходит до 8 лет (Баранова,

1999). Тем самым традиционные приемы для их размножения ограничиваются вышеуказанными особенностями биологии размножения, а микрклональное размножение можно считать наиболее оптимальным способом для получения массового количества растений этих редких видов.

В ходе проведения экспериментальной работы диссертантом разработаны эффективные методы введения в культуру *in vitro* видов рода с использованием в качестве первичных эксплантов луковичных чешуй и флоральных органов. При этом флоральные органы некоторых видов рябчиков в биотехнологических работах по микроразмножению использовались впервые. Динарой Серыкбаевной оптимизированы протоколы клонального размножения восьми редких и эндемичных видов рода, определены оптимальные режимы укоренения и адаптации растений – регенерантов к нестерильным условиям *ex vitro*, подобраны условия для длительного беспересадочного хранения культур в условиях замедленного роста и создана коллекция *in vitro* исследуемых видов.

Выяснение путей морфогенеза *in vitro* имеет важное теоретическое значение, так как вносит вклад в понимание фундаментальных основ биологии развития растений. Исследование Мурасевой Д.С. процессов индукции побегообразования *in vitro*, выявление морфогенетического потенциала различных типов эксплантов и установление путей морфогенеза по данным морфогистологического анализа для некоторых таксонов рода рябчик, проведенное впервые, имеет большое теоретическое и практическое значение, и актуальность данной работы не вызывает сомнения.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Общий объем работы 149 страниц. Она состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, содержат 15 таблиц и 30 рисунков, выводов и списка литературы, который включает 315 наименований, из них 248 на иностранных языках. Структура диссертации хорошо продумана, рубрикация разделов проработана, она представляется разумной и уместной. Хочется сразу отметить, что диссертация оформлена грамотно и аккуратно, богато иллюстрирована, что делает знакомство с ней приятным и познавательным.

Во введении обоснована необходимость биотехнологических исследований в деле сохранения растений и сформулированы цель и задачи работы, выделены основные положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, представлены данные об апробации диссертационных материалов, приведены сведения о публикациях и структуре работы. Цели и задачи диссертационной работы включают изучение процессов индукции морфогенного ответа при использовании разных типов эксплантов (луковичные чешуи и флоральные органы) и условий культивирования, получение регенерантов в культуре изолированных тканей и органов некоторых

представителей рода рябчик, проведение морфогистологического исследования для установления пути образования регенерантов (прямой органогенез, каллусогенез, эмбриоидогенез) и для разработки протокола микроконального размножения с последующей адаптацией растений к нестерильным условиям выращивания.

В Главе 1, разделенной на 4 раздела представлен очень подробный анализ литературных данных, написанный хорошим научным языком. В первом разделе обосновывается появление нового междисциплинарного направления в науке – биотехнологии сохранения растений. Описаны преимущества биотехнологических методик по сравнению с традиционными способами размножения. Во втором разделе анализируются данные, касающиеся структурных особенностей морфогенеза растений в культуре *in vitro*, вводятся основные понятия, описываются термины. В третьей части подробно анализируются факторы, влияющие на индукцию регенерации и течение процессов морфогенеза в культуре *in vitro*, такие как, генотип, тип экспланта, минеральные компоненты среды, регуляторы роста, условия культивирования. Каждый из факторов освещен подробно и основательно. В четвертой части приведены подробные данные о путях морфогенеза, которые выявлены в случае растений, имеющих аналогичную или близкую жизненную форму с объектами исследования по диссертации. В ней подробно освещены данные о влиянии биологически активных веществ, минерального состава питательных сред и типа экспланта на тот или иной путь морфогенеза в культуре *in vitro* у луковичных и др. геофитов. Обзор литературы проиллюстрирован 4 рисунками и содержит 1 таблицу с обобщенными данными. В конце обзора литературных данных диссертант подводит нас к заключению о слабой изученности представителей рода рябчик, и об актуальности проведения исследований с данными объектами.

Во второй главе убедительно, четко и исчерпывающе подробно изложены методические подходы автора и описаны объекты исследования. Она проиллюстрирована 2 рисунками, с фотографиями объектов изучения и картами ареалов, а также 1 таблицей.

Результаты исследования и их обсуждение представлены в трех главах (Главы 3 – 5). Каждая глава начинается с небольшого введения, в котором описываются имеющиеся в литературе сведения, имеющие отношение к обсуждению результатов излагаемых в главе. Глава 3 посвящена выявлению морфогенетического потенциала органов и тканей у объектов исследования, а также особенностям регенерации в условиях культуры *in vitro*. Она подразделена на три раздела. В первом разделе этой главы представлены данные по изучению регенерации побегов из луковичных чешуй. Этот раздел имеет два внутренних подраздела. В них последовательно описаны результаты сначала по введению первичных эксплантов (луковичных чешуй) в культуру *in vitro*, а затем по использованию полученных

регенерантов – луковичек, для последующего размножения, который диссертант называет этапом «собственно размножения». Все эксперименты и полученные результаты в тексте описаны подробно, и проиллюстрированы 5 таблицами и 6 рисунками. В конце главы приводится краткое обобщение полученных результатов. В работе Динары Серыкбаевны были выявлены видовые различия по скорости морфогенного ответа первичных эксплантов (луковичных чешуй). Показано, что развития каллусной ткани на этапе инициации культуры *in vitro* не происходит, т.е. регенерация микролуковичек исследуемых видов протекает по пути прямого органогенеза. На этапе собственно размножения изучаемых видов проявлялась видоспецифичность морфогенного ответа изучаемых рябчиков на действие регуляторов роста при использовании минеральных сред различного состава. В исследовании подтверждена высокая морфогенная активность луковичных чешуй, как первичных эксплантов, в культуре *in vitro*. При этом для инициации и заложения структур *de novo* необходимо воздействие на ткани экспланта регуляторов роста (БАП и НУК) и длительный начальный период культивирования до развития первых адвентивных побегов. Внесение регуляторов роста на стадии собственно размножения стимулировало побегообразование. При этом луковички из культуры *in vitro* легко включались в последующие циклы микроразмножения. Отмечено, что высокий морфогенетический потенциал у исследуемых видов сохранялся на протяжении длительного выращивания в культуре *in vitro* (2 года).

Практически со всеми заключениями Мурасевой Д.С. по результатам, представленным в первом разделе Главы 3, можно согласиться. О некоторых замечаниях будет сказано ниже по тексту отзыва.

Во втором разделе Главы 3 представлены результаты изучения регенерации побегов *in vitro* с использованием флоральных органов в качестве первичных эксплантов. Этот раздел также как, и первый, имеет два внутренних подраздела, сформированных по тому же принципу. Сначала описываются результаты введения в культуру разных органов цветка – как первичных эксплантов, причем морфогенетический потенциал тканей каждого органа обсуждается отдельно, а в конце дается краткий вывод о наиболее эффективном типе экспланта для изученных объектов рода рябчик. Во второй части этого раздела Главы 3 обсуждается влияние минерального состава сред и физиологически активных веществ на морфогенез на этапе размножения с использованием луковичек – регенерантов. Результаты второго раздела Главы 3 проиллюстрированы 4 рисунками и 2 таблицами. В конце дается объективное заключение. Мурасевой Д.С. установлено, что активность морфогенных процессов в тканях первичных эксплантов флоральных органов зависела от гормонального состава индукционных сред. Морфогенетический потенциал флоральных эксплантов *F. meleagris* возрастает в ряду: тычинки – завязь – листочки околоцветника. Для листочков

околоцветника было характерно наибольшее количество закладывающихся побегов, их следует считать более эффективными первичными эксплантами флоральной природы. В настоящей работе установлено влияние минерального состава питательной среды на частоту регенерации *F. meleagris* в культуре *in vitro* на этапе собственно размножения, когда использовались микролуковички - регенеранты. Так, культивирование на среде В5 способствовало более активной регенерации вне зависимости от вносимых регуляторов роста. Использование сред различного минерального состава, но дополненных одинаковыми регуляторами роста (5,0 мкМ БАП и 2,0 мкМ НУК) также позволило выявить различные пути морфогенеза в культуре ткани: культивирование микролуковичек на среде В5 приводило к побегообразованию, а на среде BDS отмечали разрастание тканей чешуй микролуковичек и активный каллусогенез (72,0-87,0 %).

В третьем разделе Главы 3 приведены данные по морфогистологическому изучению процессов регенерации и органогенеза *in vitro*. Достоинством данного раздела является совмещение морфологического и гистологических методов анализа процессов, что дает возможность проследить изменения, происходящие не только на поверхности экспланта, но и в его внутренних тканях. При этом создается полная картина происходящих событий при закладке регенерантов - луковичек и их органов. Данный раздел разделен на два подраздела. Это обусловлено необходимостью разделить результаты морфогистологических исследований, проведенных на разных типах эксплантов. В первом подразделе приведены данные, наблюдаемые при индукции побегообразования в случае луковичных чешуй - первичных эксплантов. Во втором – при регенерации на этапе собственно размножения, когда в качестве эксплантов используются луковички, полученные в культуре *in vitro*. Результаты проиллюстрированы 5 рисунками. Мурасовой Д.С. было показано, что наиболее характерным морфогенным ответом при введении в культуру *in vitro* первичных эксплантов (луковичных чешуй) для *F. dagana*, *F. sonnikovae* и *F. meleagris* является прямой геммогенез – образование адвентивных почек. При этом у исследуемых видов регенерация адвентивных луковичек *in vitro* протекает сходным путем. На стадии собственно размножения у *F. meleagris* (культивирование микролуковичек - регенерантов) наблюдали два типа морфогенных ответов: прямой геммогенез и активный каллусогенез с образованием регенерантов, напоминающих соматические эмбриониды. В результате проведенного гистологического исследования было установлено отсутствие сопряженного формирования у таких регенерантов апексов побега и корня на начальных этапах их морфогенеза. У них наблюдали более позднее развитие корневых апексов, разобщенное по времени с развитием апекса побега. При этом эндогенное формирование адвентивных корней отмечали в

базальной части развивающегося побега. Тем самым, был установлен путь формирования регенерантов в каллусе – гемморизогенез.

Глава 4 посвящена вопросам укоренения луковичек – регенерантов в культуре *in vitro* и адаптации растений после пересадки в нестерильные условия содержания. Она начинается небольшим введением и имеет две внутренние части. В первой изложены результаты по влиянию условий культивирования (минерального состава сред, добавления физиологически активных веществ, концентрации сахарозы, выдерживание культур при пониженных положительных температурах) на ризогенез и на морфометрические параметры луковичек. Во второй части главы представлены результаты по оптимизации состава почвы и условий содержания растений после их пересадки из культуры *in vitro* в нестерильный субстрат. В конце главы подводится некоторый итог проведенной экспериментальной работы и сформулированы рекомендации по укоренению и адаптации растений - регенерантов к нестерильным условиям выращивания. Результаты Главы 4 проиллюстрированы 6 рисунками и 3 таблицами. Диссертантом было установлено, что этап холодной стратификации на стадии укоренения стимулирует не только рост луковичек и их корней, но эта обработка также способствует быстрому прорастанию и развитию растений - регенерантов после их переноса из стерильных условий в условия *ex vitro*.

Глава 5 диссертации посвящена практическому применению методов биотехнологии для размножения других редких видов рода рябчик и создания коллекции *in vitro*. Она имеет 2 части, 4 таблицы и 3 рисунка. Последний рисунок – схема обобщает всю проделанную диссертантом экспериментальную работу по разработке биотехнологии размножения и сохранения представителей рода *Fritillaria*. Таким образом, в результате проведенной Динарой Серыкбаевной Мурасевой работы был подобраны наиболее оптимальные составы питательных сред и условия культивирования для 8 представителей рода рябчик. Разработанный диссертантом протокол размножения, включающий выбор первичного экспланта, размножение и депонирование микролуковичек *in vitro*, укоренение и дальнейшую адаптацию пробирочных растений к условиям *ex vitro*, позволяет использовать биотехнологический подход для размножения и сохранения других редких и эндемичных видов рода *Fritillaria*.

Диссертацию отличает четкий стиль и логичность изложения материала, блестящее качество иллюстраций, особенно микрофотографий. Краткое суммирование результатов в конце каждой главы значительно облегчает восприятие изложенного материала.

Вместе с тем, хочется обратить внимание диссертанта на некоторые недочеты, имеющиеся в работе, а также высказать ему ряд пожеланий на будущее.

1. Научная новизна полученных Динарой Серыкбаевной результатов не вызывает сомнения. Они подробно описаны и качественно проиллюстрированы в Главах 3-5. Однако хотелось бы, чтобы и во введении в написанном кратком изложении научных результатов была отражена, и научная значимость проведенного морфогистологического исследования, и, было бы написано, что дало использование флоральных эксплантов для научной части представленной диссертации. Тем самым, описание научной новизны проведенной работы в начале диссертации, следовало бы сделать более развернутым.

2. На стр. 22 написано, что для представителей рода *Fritillaria* «... характерен глубокий морфофизиологический покой и слабая дифференциация зародыша». Это фраза неточная. Если речь идет о морфофизиологическом типе покоя, то следует понимать, что этот тип покоя обусловлен не только физиологическими причинами, но и слабой дифференциацией зародыша.

3. На стр. 32 и 34 даются подрубрики «Эмбриогенез». На самом деле речь идет о соматическом эмбриогенезе или эмбриоидогенезе.

4. На стр. 59, по-видимому, описка. Подкраска, вероятнее всего, была сделана алциановым синим, а не *анилиновым синим*.

5. На стр. 69 неточное высказывание. Обычно пишут прямой органогенез, а не *прямая регенерация*. Каллусогенез можно также отнести к регенерации (но тканевой).

6. На стр. 72 в последнем абзаце. Поскольку луковичные чешуи часто используют для размножения, то, по-видимому, точнее было бы написать подтверждена высокая морфогенная активность луковичных чешуй, как первичных эксплантов, а не *показана*.

7. На стр. 45 написано, что «при этом прегенеративный период у рябчиков при благоприятных условиях занимает 4-7 лет в зависимости от вида», а на стр. 48. весь 2 абзац, в том числе «... развитие от семени до цветения у этих видов занимает 6-8 лет (Баранова, 1999)». Хочется обратить внимание автора, что в цитируемых работах, и по поводу семенного размножения и по онтогенезу, которые датируются 1999 и ранее, не может быть данных по одному из объектов исследования, т.к. он был открыт только в 2010 году. Следовательно, точно нельзя сказать, сколько лет длится у него то или иное возрастное состояние, а также какой у него тип покоя семян. Наверное, не следовало бы с уверенностью относить его к изученным, и считать, что у него имеют место такие же временные и физиологические особенности. В качестве пожелания, было бы правильным продолжить начатое исследование онтогенеза и биологии и экологии семенного размножения у *F. sonnikovae*, т.к. он не изучен в данном аспекте.

8. Стр 73. Написано, что «через 2-3 пассажа растения имели 1-2 ассимилирующих листа с развитой листовой пластинкой и соответствовали виргинильным растениям 2 –го

года развития. Это является свидетельством ускорения развития в культуре *in vitro*, так как в природе первый ассимилирующий лист появляется лишь на 2 год при посадке из семян»... Сравниваются луковички - регенеранты, с луковичками, полученными из семян. Но ведь в работе исследованы луковички-регенеранты, полученные из соматических тканей, а не луковички, образующиеся у сеянцев в послесеменной период, т.е. Динара Серыкбаевна не работала с семенным материалом. По-видимому, следовало бы проводить сравнение с луковичками-детками, образующимися в природных условиях. А сведений о том, как долго развиваются такие луковички, я в работе не нашла. Возможно, такие сведения отсутствуют, тем более, об их естественном развитии (в местах естественного произрастания, а не в интродукции).

Хочется заметить, что внешнее сходство не всегда указывает на одинаковое возрастное состояние. При развитии в разных условиях морфологические признаки растений могут варьировать. Кроме того, я не нашла в работе других данных, которые бы указывали на ускорение прохождения онтогенетических (возрастных) состояний у полученных в работе растений. В работе нет сведений о том, как долго длился виргинильный период (правильнее вегетативное возрастное состояние, а не виргинильное). Сведений о том, что они зацвели, я в работе также не нашла. Тем самым, не представляется возможным, оценить имело ли место ускорение развития растений-регенерантов или нет. Эти комментарии относятся к выводу 7. Следовало бы дать этот вывод в виде предположения, а не в виде установленного факта. В качестве пожелания. Затронутый вопрос очень интересный, и он, не смотря на кажущуюся простоту и на первый взгляд ясность, остается не изученным в настоящее время. Поскольку он имеет отношение к биологии развития, в том числе одного из редких неизученных видов из рода рябчик, было бы актуальным продолжить работу в данном направлении, тем более, что посадочный материал уже имеется.

9. По-видимому, имеется неточность при формулировке вывода 5. В нем речь должна идти о микролуковичках-регенерантах *F. meleagris*, которые использовали целиком. Из результатов следует (текст на стр. 80-88), что при использовании луковичных чешуй *F. meleagris*, как первичных эксплантов, имелся только один ответ - прямой органогенез, а при использовании микролуковичек (при собственно размножении) получали ответ, который зависел от минеральной основы питательных сред.

В целом, диссертация Д.С. Мурасевой производит очень благоприятное впечатление как по объему оригинального материала полученного лично автором, так и по уровню его осмысления и анализа результатов. Уровень работы не оставляет сомнений в том, что перед нами — качественная кандидатская диссертация.



Возникшие при чтении текста замечания носят дискуссионный либо технический характер и не сказываются на общей оценке работы.

Диссертация Д.С. Мурасевой представляет завершённую научно-исследовательскую работу, вносящую существенный вклад в решение общей проблемы биологии развития растений и заслуживает самой высокой оценки.

Выводы диссертации, разработанные в ней подходы и методы исследования, соответствуют поставленным целям и задачам работы.

Результаты исследования отражены в 10 публикациях (в том числе в изданиях из списка ВАК – 3). Основные результаты диссертации доложены на международных и российских научно-практических конференциях. Содержание автореферата соответствует диссертации.

Представленная диссертация Мурасевой Д.С. «РАЗМНОЖЕНИЕ И СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO* РЕДКИХ И ЭНДЕМИЧНЫХ ВИДОВ РОДА *FRITILLARIA* L.» является завершённым, высококвалифицированным исследованием. Диссертация соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор - Мурасева Динара Серыкбаевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 - «Ботаника».

Кандидат биологических наук (03.00.05 – «Ботаника»)  
старший научный сотрудник,  
Андропова Елена Валентиновна

Подпис  
ЗАВЕД

]

£

Лаборатория эмбриологии и репродуктивной биологии,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Ботанический институт им. В.Л.Комарова РАН (БИН РАН),

Адрес: 197376 Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 2  
тел. (812) 372 54 41, (812) 272 54 24

<http://www.binran.ru/>

e-mail [elena.andronova@mail.ru](mailto:elena.andronova@mail.ru), [elena\\_andronova@binran.ru](mailto:elena_andronova@binran.ru)

5 сентября 2016 г