

## Отзыв

официального оппонента к.б.н. Титовой Галины Евгеньевны  
на диссертационную работу Тимофеевой Светланы Николаевны  
«Размножение *Laburnum anagyroides* Medik. в условиях *in vivo* и *in vitro* при интродукции  
в Нижнем Поволжье», представленную на соискание  
учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.9. Ботаника

**Актуальность темы исследования.** Интродукция растений не только способствует расширению ассортимента культивируемых растений, но и является одним из методов решения некоторых вопросов теоретической ботаники и изучения растения вне их естественных мест обитания (*ex situ*), что важно для реализации программ сохранения биоразнообразия. В настоящее время ассортимент древесных декоративных растений в регионах с умеренным климатом весьма ограничен. Его расширение возможно как за счет непосредственного введения в культуру новых интродуцентов, так и посредством использования их в качестве исходного материала для селекции устойчивых к новым условиям сортов и линий. При интродукции растений зачастую возникают различные проблемы с их размножением. К числу таких растений относится бобовник анагировидный (*Laburnum anagyroides* Medik.) – высоко декоративное и лекарственное древесное средиземноморское растение, широкое использование которого в практических целях ограничивается сложностью размножения традиционными методами в регионах, эколого-климатические условия которых отличаются от мест естественного произрастания. Диссертационная работа Тимофеевой С.Н. посвящена оценке эффективности интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье и решению проблемы его размножения. Тема диссертационного исследования актуальна и значима для решения ряда вопросов интродукции растений. Разработка методов искусственного размножения *L. anagyroides* и возможность массового получения посадочного материала и исходного материала для селекции определяет практическую ценность диссертационного исследования.

**Научная новизна.** Впервые изучены феноритм и особенности семенного размножения *L. anagyroides* в условиях умеренно-континентальном климате Нижнего Поволжья. Показана успешность интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье. Установлены причины, осложняющие естественное семенное размножение *L. anagyroides*. Разработаны эффективные методы искусственного выведения семян *L. anagyroides* из состояния органического покоя. Впервые разработаны протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием ювенильного и зрелого

растительного материала. Выявлены гистологические особенности развития адвентивных побегов в культуре *in vitro*, обоснована целесообразность их использования для увеличения эффективности микроразмножения.

**Теоретическая и практическая значимость.** Выявленная диссертантом успешность интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье и разработанные методы его искусственного размножения открывают перспективы для широкого использования этого растения в качестве высоко декоративной культуры в регионах, которые характеризуются сходными с Нижним Поволжьем эколого-климатическими условиями. Результаты исследования могут быть использованы для массового размножения бобовника анагировидного в практических целях и получения исходного материала для селекционно-генетических работ. Материалы диссертации используются при чтении специального курса «Биотехнология» и при проведении лабораторных работ «Большого практикума» направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология в Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

**Личный вклад соискателя.** Диссертация «Размножение *Laburnum anagyroides* Medik. в условиях *in vivo* и *in vitro* при интродукции в Нижнем Поволжье» является законченным самостоятельно выполненным научным исследованием. Научные результаты получены автором диссертации лично. Автором самостоятельно выполнены фенологические наблюдения, разработаны методы выведения семян из состояния физического покоя и протоколы клонального микроразмножения *L. anagyroides*; проведена статистическая обработка результатов; сформулированы выводы; приготовлены микрофотографии. В процессе работы автор решил поставленные задачи и сделал необходимые научно-обоснованные выводы.

**Положения, выносимые на защиту,** отражают полученные автором новые результаты и согласуются с основными выводами.

#### **Общая характеристика работы**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и приложения. Объем работы – 161 страница. Она содержит 19 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 316 источников, в том числе 163 на иностранных языках.

**Во введении** автором обоснована актуальность и научная значимость проведенного исследования: подчеркнуто, что расширение ассортимента высоко декоративных растений особенно актуально в отношении деревьев и кустарников, выращиваемых в регионах с умеренным климатом, а возрастающий спрос на лекарства

природного происхождения делает актуальным создание сырьевой базы для их производства и интродукцию лекарственных растений. Актуальность исследования, полностью обоснована автором и не вызывает сомнений, цели и задачи четко сформулированы.

**Глава 1** включает обзор литературных данных по систематической принадлежности и синонимике *Laburnum anagyroides*, его распространении, биологии развития в различных экологических условиях, чувствительности растений к факторам среды. Рассмотрена история введения вида в культуру и традиционные методы его размножения (семенное и искусственное вегетативное размножение посредством черенков); подчеркнута ограниченность сведений об особенностях его выращивания и размножения. Также отмечено значение биотехнологических приемов размножения растений *in vitro*, которые, несмотря на их значительные преимущества, почти не разработаны для *L. anagyroides*. В связи с этим рассмотрены история метода культуры тканей и органов *in vitro*, классификация типов клонального микроразмножения растений, особенности этого процесса у древесных растений и факторы, осложняющие его эффективность, состав используемых питательных сред. Подчеркнута наибольшая надежность метода активация существующих в растениях меристем побегов, обеспечивающего получение потомства, генетически идентичного исходному экземпляру, а также значение использования для этих целей проростков – как эксплантов с высоким регенерационным потенциалом.

В **Главе 2** даны характеристика растительного материала и описание методов исследования. Материалом исследования явились несколько экземпляров *L. anagyroides*, произрастающих в дендрарии Ботанического сада Саратовского государственного университета – один, выращенный из семян, полученных из Ботанического сада АН Молдавии (1974) и два его разновозрастных потомка, полученные посредством семенного размножения. Охарактеризованы природно-климатические условия пункта интродукции. Подробно изложены методы изучения феноритма растений, успешности их интродукции, биологии цветения и опыления, а также методы цитозембриологического анализа, оценки семенной продуктивности растений и посевных качеств формирующихся семян, способы их выведения из состояния органического покоя и выращивания проростков на различных субстратах. Также охарактеризованы использованные методы культивирования различных эксплантов *L. anagyroides in vitro* и гистологического анализа полученных регенерантов. Все количественные данные обработаны математически с использованием пакета компьютерных программ статистического и биометрико-генетического анализа в растениеводстве и селекции «AGROS», для сравнения средних значений независимых



выборок использован многогранговый тест Дункана (одно- и двухфакторный дисперсионный анализ). Глава позволяет оценить объем и детальность проведенных экспериментальных исследований, широту спектра использованных методов.

В **Главе 3** изложены результаты проведенного исследования. В первом разделе главы приводятся результаты оценки успешности интродукции *L. anagyroides* в Нижнем Поволжье. На основании данных по прохождению основных фенофаз показано, что в данных условиях растения *L. anagyroides* регулярно проходят полный цикл сезонного развития и по ритму развития вегетативных побегов относятся к растениям с поздним началом вегетации, по началу цветения – к ранне-летней, по длительности цветения – к средне-цветущей, а по созреванию плодов – к поздне-летней фенологической группе. Оценка успешности интродукции показала полную адаптацию растений *L. anagyroides* к условиям Нижнего Поволжья (общее акклиматизационное число 84 балла), а также их высокую устойчивость к вредителям и болезням. Вместе с тем, автором установлено, что несмотря на регулярное цветение и завязывание семян, случаи самосева у *L. anagyroides* были единичными, а развивающиеся проростки быстро погибали.

Во втором разделе представлены результаты цитозембриологического анализа развития генеративных органов растений *L. anagyroides* в условиях интродукции, оценки их семенной продуктивности и экспериментов проращивания семян в различных условиях. Показано, что основные эмбриологические процессы в условиях интродукции протекают без отклонений. Для растений характерно высокое количество и качество пыльцы, отсутствие аномальных и дегенерирующих зародышевых мешков в семязачатках, нормальное развитие зародыша и эндосперма (образующихся в результате оплодотворения) и формирование полноценных семян, хотя и с относительно низкой реальной семенной продуктивностью. Вместе с тем, диссертантом выявлены существенные осложнения в процессе прорастания семян, обусловленные их глубоким экзогенным (физическим) покоем. Установлены эффективные режимы температурных предобработок для его нарушения и характер влияния разных режимов на развитие проростков (на разных субстратах). В результате этой части исследования автором сделано заключение о нормальности прохождения эмбриологических процессов у *L. anagyroides* в условиях интродукции, обусловленности отсутствия их самосева затрудненным прорастанием семян, а также оптимальном режиме обработки семян для получения массового количества проростков с наименьшим количеством морфозов – культивирование высокотемпературно предобработанных семян на среде MS (дополненной 0,5 мг/л БАП), позволяющей также получать стерильные проростки для их последующего клонирования *in vitro*.

Третий раздел посвящен разработке способов клонального микроразмножения *L. anagyroides* методом активации пазушных пресформированных меристем побегов при культивировании ювенильного (прорастающие семена) и зрелого материала (вегетативные почки и узловыe сегменты побегов). Приведены результаты сравнения прорастания интактных и температурно предобработанных семян на питательных средах различного состава, апробации различных сред для индукции образования дополнительных побегов на изолированных эксплантах проростков (включающих гипокотиль, семядоли и почечку) и эффективности микроразмножения посредством узловых сегментов побегов и изолированных почек взрослых растений на разных средах. В результате анализа этих данных автором сделано заключение о перспективности использования как зрелого, так и ювенильного материала *L. anagyroides* для инициации и размножения культур *in vitro*, значительно большей эффективности использования для этих целей среды MS (по сравнению со средой WPM) и оптимальных индукторов морфогенеза в этих условиях (БАП и НУК, с концентрацией 0,5 мг/л). Также, на основе результатов гистологического анализа процессов морфогенеза в культуре проростков автором показана возможность повышения коэффициента размножения микропобегов *in vitro* за счет использования не только боковых, но и адвентивных побегов, которые развиваются за счет пролиферативной активности меристем базальной части основного побега.

**Глава 4** содержит обсуждение результатов проведенного исследования. В результате сопоставления полученных данных с литературными данными по различным аспектам биологии развития *L. anagyroides* в естественных условиях произрастания и при интродукции в различные эколого-климатические зоны (сравнение сроков прохождения основных фенофаз, биологии цветения и плодоношения, протекания эмбриологических процессов, показателей потенциальной и реальной семенной продуктивности, прорастания семян) автором сделано заключение об полной адаптации и успешности интродукции *L. anagyroides* в условиях Нижнего Поволжья. В то же время, сравнение различных параметров выявило определенные нарушения в процессах репродукции, в частности, снижение коэффициента репродукции вследствие отсутствия оплодотворения значительной части семязачатков, что может быть связано с различными факторами, в том числе, осложнением перекрестного опыления из-за разобщенности экземпляров на территории Ботанического сада. Интродуцированные растения характеризовались низкой полевой и лабораторной всхожестью семян (8-12%) в сравнении с растениями, произрастающими в естественных местообитаниях (до 70%), что связано с новыми эколого-климатическими условиями. Так, автором обосновано, что жаркий, засушливый период созревания семян стимулирует их быстрое обезвоживание, формирование

твердосемянности (физический покой) и, тем самым, отсутствие естественного самосева, а гибель единичных проростков, образующихся при этом самосеве, происходит вследствие быстрого таяния снега, обильных весенних осадков и избыточного увлажнения суглинистых почв в условиях интродукции. В целом результаты этой части обсуждения позволили сформулировать автору перечень основных факторов, лимитирующих реализацию семенного размножения *L. anagyroides* в условиях Нижнего Поволжья.

Технология клонального мироразмножения *L. anagyroides* разработана диссертантом впервые. В результате обобщения полученных результатов автором подчеркнута возможность получения посадочного материала *L. anagyroides* только в лабораторных и тепличных условиях, с соблюдением определенной последовательности технологических процессов, и с учетом специфических особенностей размножения *L. anagyroides in vitro* - более эффективного использования в качестве первичных эксплантов одиночных почек (по сравнению с узловыми сегментами), которые могут быть успешно иницированы в различные сезоны; эффективной стимуляции регенерации побегов при микроразмножении как ювенильного, так и зрелого материала посредством БАП (0,5 мг/л) со стабильной длительной пролиферацией (2-3 года) и коэффициентом размножения в среднем 4-5 микропобегов. Обсуждение результатов этой части позволили автору разработать протоколы микроразмножения *L. anagyroides* для получения элитных, адаптированных к новым условиям, генотипов и получения исходного материала для селекции (часть протоколов запатентована). Особого внимания заслуживает тот факт, что результаты проведенного исследования могут быть использованы для массового размножения *L. anagyroides* в регионах, условия которых существенно осложняют его естественное семенное размножение.

**Заключение и Выводы** диссертации в полной мере отражают новизну полученных результатов.

Следует отметить, что диссертация С.Н. Тимофеевой представляет собой оригинальное законченное научное исследование, в ней содержится большой объем экспериментальных данных, полученные результаты и сделанные на их основе выводы имеют большое теоретическое и, что особенно важно - существенное прикладное значение. Работа хорошо оформлена, четко структурирована, с грамотными формулировками, в полной мере отражающих обсуждаемый материал. В работе почти не содержится опечатки.

В качестве небольших замечаний можно отметить использование некоторых неудачных терминов и выражений:



1) С. 49 (3 абзац) – «полисадного слоя из макросклеридов» - правильное говорить «палисадный слой из макросклерид».

2) С. 89 (1 абзац) – «...при культивировании ювенильного (семена) и зрелого растительного материала (вегетативные почки и узловые сегменты побегов)». Семена – это не ювенильные материал, правильное написать прорастающие семена.

Высказанные замечания, однако, нисколько не умаляют достоинств диссертационной работы,

В целом считаю, что диссертационная работа С.Н. Тимофеевой «Размножение *Laburnum anagyroides* Medik. в условиях *in vivo* и *in vitro* при интродукции в Нижнем Поволжье», соответствует всем требованиям, установленным "Положением о порядке присуждения ученых степеней" (утверждено постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842) и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и ее автор Тимофеева С.Н. безусловно заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.9. Ботаника.

Кандидат биологических наук  
(специальность 03.00.05 - "Ботаника"),  
Ведущий научный сотрудник с возложением  
обязанностей заведующей лабораторией эмбриологии и  
репродуктивной биологии  
Федерального Государственного учреждения науки  
«Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН!»  
197361, г. Санкт-Петербург,  
ул. Проф. Попова, д.2  
Тел.: (812) 372-54-41  
E-mail: [G.Titova@binran.ru](mailto:G.Titova@binran.ru)  
25 января 2022г

Титова Г.Е.

