

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кхуат Ван Куэт на тему: «Биологические особенности размножения *in vitro* эндемичных видов *Atomum* ROXB. и изучение биологической активности их экзометаболитов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология

**Актуальность работы.** В настоящее время в большинстве стран важнейшей проблемой остается сохранение редких, эндемичных видов растений и расширения ареала их выращивания в этих странах. Одной из ценных культур Вьетнама является кардамон – лекарственное растение, широко применяемое в народной медицине, фарминдустрии, а также в пищевой промышленности. Основные способы размножения исследуемых видов – семенной и вегетативный, в частности, с помощью корневищ. Однако, данные способы имеют как преимущества, так и недостатки. Например, семена растений рода *Atomum* отличаются твердой оболочкой, которая препятствует прорастанию семян и массовому получению посадочного материала, а использование вегетативных органов нередко приводит к передаче вирусных инфекций, что способствует снижению урожая и получению плодов низкого качества. Решить данную проблему можно за счет применения методов биотехнологии, которые позволяют также значительно ускорять и удешевлять селекционный процесс.

В настоящее время ученые проводят исследования по размножению *in vitro* некоторых видов рода *Atomum*, однако таких работ по пурпурному кардамону (*Atomum longiligulare*) явно недостаточно, а по черному кардамону (*Atomum tsao-ko*), они вообще не известны. Эти виды являются важными лекарственными растениями. В традиционной медицине семена черного и пурпурного кардамона используют как лекарство при респираторных заболеваниях, миалгии, неврозах, ревматизме. Кроме того, их эфирное масло обладает противомикробным и противогрибковым действием, а экстракты могут оказывать ингибирующее действие на рост клеток рака. Однако, применяемые в настоящее время методы размножения имеют

определенные ограничения, в связи с чем получение *in vitro* высококачественного посадочного материала позволит решить данную проблему. Все это свидетельствует, что тема диссертационной работы Кхуат Ван Куэт «Биологические особенности размножения *in vitro* эндемичных видов *Amomum* ROXB. и изучение биологической активности их экзометаболитов», безусловно, актуальная, а полученные результаты имеют как теоретическое, так и практическое значение.

**Научная новизна работы.** Диссертантом впервые проведены всесторонние исследования двух эндемичных видов *Amomum* в культуре *in vitro* и разработаны протоколы размножения в зависимости от их биологических особенностей. Автором проведены подробные исследования анатомического строения семян пурпурного и черного кардамона, установлены их морфологические особенности и разработаны схемы получения асептических культур из семян. Соискателем оптимизированы условия культивирования (состав питательной среды по минеральному и гормональному составу) изолированных эксплантов, обеспечивающие высокий коэффициент размножения микропобегов и их последующее укоренение. Следует отметить, что соискателем проведены также многоплановые исследования по определению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из различных вегетативных органов черного и пурпурного кардамона.

**Практическая и теоретическая ценность работы.** Разработанный протокол клонального микроразмножения черного кардамона и пурпурного кардамона позволяет получать высококачественный посадочный материал исследуемых видов в неограниченном количестве, что позволяет решить проблему сохранения их биоразнообразия во Вьетнаме. Кроме того, предлагаемая технология может быть применена для размножения других видов семейства *Zingiberaceae*. Автором установлено, что экстракты, полученные из различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона обладают фунгицидной активностью, что позволит их

использовать в качестве альтернативных препаратов для борьбы с болезнями растений, вызываемых патогенными грибами. Применение таких препаратов будет способствовать устойчивому развитию сельского хозяйства, а также снизит негативное воздействие на окружающую среду и здоровье человека.

Полученные результаты могут быть применены в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических работ по дисциплинам «Физиология растений», «Сельскохозяйственная биотехнология», «Культура клеток и тканей растений» для студентов, обучающихся по направлениям «Биотехнология» и «Агрономия».

**Структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, трех экспериментальных глав, заключения и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 181 странице компьютерного текста, содержит 37 таблиц, 66 рисунков. Библиографический список включает 205 источников, в том числе 201 на иностранном языке.

Автором во введении четко сформулированы цели и задачи исследовательской работы, показана научная и практическая значимость. В первой главе оценено состояние изученности вопроса на основе анализа большого количества современной зарубежной литературы. Литературный обзор изложен хорошим языком и дает полное представление о глубине проработки автором решаемых задач. Дана ботаническая характеристика исследуемых видов кардамона, проанализирован состав вторичных метаболитов, синтезируемых различными органами растений кардамона, а также представлены результаты по их применению в медицине и фарминдустрии. В конце литературного обзора соискатель уделит внимание анализу литературных данных, касающихся культивированию различных видов кардамона в условиях *in vitro* и показал значимость исследований для черного и пурпурного кардамона.

Во второй главе диссертантом дана характеристика исследуемых видов кардамона и приведена достаточно подробная методика выполнения

исследовательских работ и статистической обработки полученных данных.

Третья глава посвящена особенностям получения асептических культур *Atomum tsao-ko* и *Atomum longiligulare* из семян и корневищ и разработан оригинальный протокол стерилизации растительного материала для каждого типа эксплантов. Автором проанализированы биологические особенности строения семян, благодаря чему он смог оптимизировать схему получения асептической культуры. Диссертантом установлено, что на прорастание семян оказывают влияние, как стерилизующие вещества, так и состав питательной среды, а также различные способы предварительной обработки семян (скарификация, применение регуляторов роста и кислот, термическая обработка). В заключительной части главы представлены результаты по получению асептических культур из подземных частей растений. Предлагаемая схема стерилизации позволяет получать высокий выход асептических культур, при сохранении жизнеспособности спящих почек.

В четвертой главе диссертант представил результаты по особенностям размножения и укоренения черного и пурпурного кардамона *in vitro* в зависимости от гормонального состава питательной среды. Им показано, что для черного кардамона оптимальной для микроразмножения является питательная среда, содержащая минеральные соли по прописи Мурасиге-Скуга (МС), дополненная 1,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л НУК, а для пурпурного кардамона – питательная среда МС, дополненная 1,5 мг/л БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК. Коэффициент размножения при этом был максимальным. Автором также установлено, что при укоренении микрочеренков целесообразно применять ИМК или НУК.

В пятой главе диссертантом представлены результаты по изучению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов *A. tsao-ko* и *A. longiligulare*. Показана их аллелопатическая активность по отношению к проросткам пяти видов растений (капуста белокочанная, рыжик посевной, томат, киноа, лук), а также двух видов

фитопатогенных грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*). Установлено, что экстракты, полученные из семян *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* обладают наибольшей биологической и фунгицидной активностью. В заключении этой главы автором приведены данные по изучению суммарного содержания фенольных соединений в экстрактах исследуемых объектов, на основании чего им сделан вывод о причинах различной биологической активности этих экстрактов. Диссертантом показано, что экстракт из семян, проявляющий наибольшую биологическую активность, имел самое высокое общее содержание фенольных соединений. Им также отмечено, что в экстрактах, полученных из пурпурного кардамона, содержание веществ фенольной природы было выше по сравнению с черным кардамоном.

Достоверность результатов исследований не вызывает сомнений. Все данные статистически обработаны. Сделанные выводы логично вытекают из полученных автором результатов. Работа написана грамотным научным языком, хорошо иллюстрирована и имеет законченный вид. Содержание автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

Результаты работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях, основное содержание диссертационной работы достаточно полно отражено в 14 научных работах, опубликованных в отечественных и зарубежных изданиях. В их числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 4 статьи в журналах, индексируемых в международных базах Scopus и Web of Science.

При анализе диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. Диссертация посвящена в первую очередь исследованию биологических особенностей размножения *in vitro* эндемичных видов *Atomum*, однако рассмотрению этих объектов в этих условиях (в частности *Atomum longiligulare*, по которому имеются опубликованные данные) автор в обзоре литературы уделяет всего одну страницу.

2. На стр. 32 и 33 сказано «В лаборатории кусочки корневищ черного

кардамона были использованы для культивирования инициации». Не понятно, что означает словосочетание «культивирования инициации»?

3. Из текста параграфа 2.2.6 неясно довели ли пробирки до постоянной массы для «определения количества экстрагируемого вещества» и дальнейшего его использования для приготовления экстрактов.

4. В начале главы 3, на стр. 52 диссертант утверждает, что «Для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* исследования в культуре *in vitro* ранее не проводились». А как же работы, проведенные Dang et al. (2011) и Rao et al. (2003), на которые он сам ранее ссылался?

5. На стр. 65 автор пишет: «Наилучшие результаты по получению стерильной культуры (58,89–80,00%) были получены при использовании сулемы в различных временных экспозициях воздействия на семена. Причем в варианте обработки семян в течение 10 минут было зарегистрировано получение в 80,0% случаев стерильность культуры». Далее диссертант пишет, что «Однако следует отметить, что при дезинфекции семян 0,1%-ным раствором сулемы в течение 15 мин был получен наилучший результат, но в последующие сутки наблюдений на поверхности многих семян появилась грибная инфекция». Во-первых, последнее утверждение противоречит данным, приведенным в таблице 3.6. Во-вторых, если в таблице 3.6 приведены данные с учетом приведенной особенности, то как автор объяснит этот феномен? Неужели 10 минут обработки сулемой достаточно для получения стерильных семян, а 15 минут недостаточно?

6. В главе 4 на стр. 81, 84, 91, 93, 94, 95 в таблицах 4.1, 4.2, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 и тексте не указано, какого размера были экспланты, которые использовали для изучения способности адвентивного побегообразования.

7. На стр. 94-95 в таблицах 4.7 и 4.8 указаны концентрации 0,1 БАП и 0,1 кинетина, использовавшиеся для образования побегов у *Atomit longiligulare*. Это действительно так или имеет место опечатка, и автор использовал более высокие их концентрации?

8. На стр. 98 диссертант указывает, что наилучшие результаты были получены при использовании НУК в концентрации 0,5 мг/л, а при увеличении концентрации НУК в питательной среде до 0,75-1,0 мг/л, способность микропобегов к укоренению оставалась высокой (100%), но количество образовавшихся корней уменьшалось, они были тонкими и не имели разветвления». Однако далее он заключает «...на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что оптимальные режимы культивирования микропобегов *A. longiligulare*, обеспечивающие укоренение, является питательная среда МС, дополненная ИМК или НУК в концентрации 1,0 мг/л». Таким образом, из текста совершенно непонятно, какие все-таки концентрации НУК и ИМК были оптимальными для укоренения микропобегов *A. Longiligulare*: 0,5 мг/л или 1,0 мг/л?

9. В связи с тем, что для обоих изучаемых видов условия введения в культуру *in vitro*, а также условия образования и укоренения побегов были сходными, полученные результаты лучше было бы представить в 3-й и 4-й главах не последовательно, а вместе, в сравнительном аспекте, более наглядном на наш взгляд, как это сделано в главе 5, избежав бы при этом также ненужных повторений.

10. На стр. 157 в заключении к главе 5 диссертант пишет о стимулирующем влиянии изученных экстрактов на прорастание семян, однако из представленных данных это не следует и в описании результатов этой главы такое влияние не отмечено.

11. Одной из поставленных диссертантом задач являлась разработка технологии «адаптации микроклонов *Atomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Atomum longiligulare* T.L. Wu к условиям *ex vitro*». В связи с чем, вызывает сожаление тот факт, что автор не уделил внимания этому вопросу в выводах.

**Заключение.** Сделанные замечания носят в основном дискуссионный характер и не снижают научную и практическую значимость работы. Следует отметить, что диссертационная работа Кхуат Ван Куэт выполнена автором самостоятельно на высоком методическом уровне и является

законченной научно-квалификационной работой, которая отвечает требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа имеет внутреннее единство, содержит обобщенный материал научных результатов и положений, выдвигаемых диссертантом для публичной защиты, что свидетельствует о личном вкладе автора в науку и практику. Предложенные автором новые решения научно аргументированы. Выводы соответствуют полученным результатам экспериментов.

Считаю, что диссертационная работа Кхуат Ван Куэт на тему: «Биологические особенности размножения *in vitro* эндемичных видов *Атомит* ROXB. и изучение биологической активности их экзометаболитов» по своему объему, методическому уровню выполненных исследований, новизне, актуальности, теоретической и практической ценности полученных результатов соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней»), а ее автор, Кхуат Ван Куэт, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент:


профессор кафедры промышленной химии и биотехнологии  
Федерального государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Орловский государственный  
университет имени И.С.Тургенева»,  
доктор биологических наук


(03.01.05 – физиология и биохимия растений, 2011),

доцент  Бондарев Николай Ильич

Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего образования «Орловский государственный университет имени  
И.С.Тургенева» (ФГБОУ ВО «Орловский государственный университет имени  
И.С.Тургенева»), 302026, Орловская  
область, г. Орел, ул. Комсомольская, 10. Телефон: +7(4862)751-318, e-mail:  
info@oreluniver.ru



 заверяю.  
секретарь ученого совета  
«Орловский государственный  
университет имени И.С. Тургенева»  
Н.Н. Чаадаева

 29.05.2022.