

## ОТЗЫВ

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

**Актуальность работы.** В настоящее время одним из перспективных направлений биотехнологии является сохранение биоразнообразия растений и создание генетических банков *in vitro*. По прогнозам к середине XXI века число видов растений, находящихся под угрозой исчезновения, увеличится с 18 тысяч в настоящее время до 60 тысяч. Особый интерес представляют лекарственные растения, как источники физиологически активных веществ, представляющих интерес для медицины и фарминдустрии. К таким видам относятся различные виды *Amomum*, произрастающие на территории Вьетнама и широко используемые в традиционной медицине как ценные лекарственные растения.

Использование системы *in vitro* по сравнению с традиционными методами поддержания коллекций растений имеет ряд преимуществ: высокие коэффициенты размножения; миниатюризация процесса, приводящая к экономии площадей, занятых маточными и размножаемыми растениями; оздоровление посадочного материала от нематод, грибов и бактерий, вызывающих болезни растений; возможность длительного депонирования образцов с меньшими затратами на хранение. В условиях *in vitro* удастся размножить и укоренить те растения, которые трудно размножаются традиционными способами.

В мире проводят исследования по размножению *in vitro* некоторых видов рода *Amomum*. Во Вьетнаме исследования такого плана малочисленны. Как правило, исследования проводили на растениях пурпурного кардамона (*A. longiligulare*) и совсем не изучен в культуре *in vitro* черный кардамон (*A. tsao-ko*). Традиционно эти виды размножают семенами и корневищами. Однако, из-за твердой оболочки всхожесть семян очень низкая, а размножение корневищами может вести к передаче заболеваний, вызываемых вирусами, грибами или бактериями, что ведет к снижению урожая и получению плодов низкого качества. Применение методов

биотехнологии позволяет решить данную проблему путем получения высококачественного посадочного материала *in vitro*.

Исходя из вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа Кхуат Ван Куэт на тему: «Биологические особенности размножения *in vitro* эндемичных видов *Amomum* ROXB. и изучение биологической активности их экзометаболитов» является своевременной, актуальной, а полученные результаты имеют, как теоретическое, так и практическое значение.

**Научная новизна работы** заключается в том, что автором впервые изучены в культуре *in vitro* эндемичные виды *Amomum* (*Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare*), произрастающие во Вьетнаме, установлены биологические особенности их размножения *in vitro* и разработана технология клонального микроразмножения.

Соискателем впервые проведены исследования морфологических и анатомических характеристик семян *A. tsao-ko* и *A. longiligulare*, а также определены их посевные качества. Впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан протокол получения асептической культуры из семян, а также из подземных частей растения (корневищ), содержащих спящие почки; разработаны питательные среды для размножения и укоренения микропобегов; осуществлена адаптация микроклонов к условиям *ex vitro*. Диссертантом впервые для черного и пурпурного кардамона проведены исследования по определению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов растений. Показана их аллелопатическая активность по отношению к семенам 5 видов растений, а также 2 видов фитопатогенных грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*). Проведен анализ растительных экстрактов, полученных из различных органов интактных растений, на суммарное содержание фенольных соединений и флаваноидов.

**Теоретическая и практическая ценность работы** заключается в том, что разработанная технология размножения *A. tsao-ko* и *A. longiligulare in vitro* позволяет не только решить проблемы сохранения биоразнообразия, но и при необходимости получать достаточное количество материала для создания искусственных популяций и выполнения работ по реинтродукции редких видов. Кроме того, предлагаемая технология размножения черного и пурпурного кардамона *in vitro* может быть применена и для размножения других видов семейства *Zingiberaceae* Lindl.

Полученные результаты могут быть использованы 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 Кхуат Ван Куэт изложена на 181 страницах компьютерного текста; состоит из введения, 5 глав (обзор литературы, материалы и методы исследований и 3-х глав экспериментальной части), выводов и списка литературы. Работа содержит 37 таблиц, 66 рисунков. Библиографический список включает 205 источников, в том числе 201 – на иностранном языке.

В первой главе (обзор литературы) автором приводится подробная ботанико-фармакогностическая характеристика исследуемых видов кардамона, дается описание наиболее ценных для традиционной медицины вторичных метаболитов, синтезируемых в различных органах растений, а также уделяется достаточное внимание анализу научных публикаций по культуре тканей растений семейства *Zingiberaceae* Lindl.

В особый раздел автор выделил культуру клеток растений рода *Amomum*, привел информацию о влиянии различных факторов культивирования на морфогенетический потенциал исследуемых видов кардамона

В заключении литературного обзора формулируется обоснованный вывод о целесообразности проведения исследований, направленных на изучение морфогенетического потенциала *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* в культуре *in vitro* и установление биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов изучаемых видов.

Во второй главе подробно описаны применяемые автором методы, охарактеризованы объекты исследований, приведены схемы и условия экспериментов. Из этой главы следует, что диссертант в своей работе применял современные методы исследования, опыты проводил на высоком методическом уровне, а достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как все полученные данные были статистически обработаны.

Основная часть диссертации – экспериментальные данные, они изложены в трех главах.

В главе 3 «Особенности введения в культуру *in vitro* первичных эксплантов *Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare*» соискателем

представлены результаты большой работы по разработке регламента получения асептической культуры из семян и корневищ исследуемых видов, подобраны условия предварительной обработки семян, обеспечивающие высокую способность к прорастанию. Установлено, что для повышения всхожести и получения равномерного прорастания семян целесообразно применять для черного кардамона – механическую скарификацию (надрезы скальпелем), а для пурпурного кардамона – химическую скарификацию (замачивание в 50%-ной HNO<sub>3</sub> в течение 15 мин). Особое внимание заслуживают исследования особенностей семян с помощью электронной микроскопии. Автором изучены биологические особенности строения семян, которые влияют на всхожесть семян и дальнейшее формирование проростков.

В главе 4 «Особенности размножения и укоренения *Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare* в культуре *in vitro*» приведены экспериментальные данные по влиянию условий культивирования, в частности минерального и гормонального состава питательной среды на морфогенез исследуемых видов в культуре *in vitro*. Диссертантом впервые для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* разработан эффективный протокол микроразмножения с использованием в качестве экспланта верхушек побегов, которые рекомендуется культивировать на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасиге-Скуга, дополненной 1,0 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л НУК (для черного кардамона) и 1,5 мг/л БАП в сочетании с 0,25 мг/л НУК (для пурпурного кардамона). На этих питательных средах коэффициент размножения побегов составляет 5-6. Кроме того, соискателем установлено, что при укоренении микрочеренков целесообразно применять ИМК или НУК в концентрации 0,5 мг/л. В этом случае достигается 100% укоренение микропобегов, формируются микроклоны высотой в среднем 5-8 см и средним количеством корней на одно растение 14-16 шт.

В главе 5 «Биологическая и фунгицидная активность экстрактов, полученных из разных органов *Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare*» автором впервые проведены комплексные исследования по изучению биологической и фунгицидной активности экстрактов, полученных из разных органов *Amomum tsao-ko* и *Amomum longiligulare*. Показана их аллелопатическая активность по отношению к проросткам, полученных из семян 5 видов растений (капуста белокочанная, рыжик посевной, томат,

киноа, лук), а также 2 видов фитопатогенных грибов (*F. oxysporum* и *H. sativum*).

Установлено, что этанольные экстракты различных частей черного кардамона и пурпурного кардамона обладают аллелопатическим потенциалом для инвазивных видов растений, поскольку было показано, что тестируемые виды растений чувствительны к соединениям, присутствующим в исследуемых экстрактах. Для черного и пурпурного кардамона исследования такого плана были проведены впервые. Кроме того, диссертантом показано, что экстракты, полученные из семян, обладали большей фунгицидной активностью по сравнению с другими вариантами экстрактов. Вероятно, это связано с повышенным содержанием в них растворимых фенольных соединений и флаваноидов. Это было доказано автором в последующих исследованиях.

Следует отметить хороший уровень биотехнологических и биохимических исследований, высокий уровень иллюстративного материала и статистический анализ данных. Несомненным достоинством работы является хорошее знание автором работ других исследователей по культуре тканей растений семейства *Zingiberaceae* Lindl. и умение в каждом случае сопоставлять и анализировать полученные результаты в сравнении с результатами других исследователей.

#### **Замечания по диссертации.**

Положительно оценивая работу Кхуат Ван Куэт, в тексте диссертации можно отметить следующие дискуссионные и недостаточно ясные моменты:

1. Раздел 1.3 «Изучение *Amomum tsao-ko* Crevost & Lemarié и *Amomum longiligulare* T.L. Wu. *in vitro*» главы 1 (стр. 29) правильней было назвать: «Изучение растений семейства *Zingiberaceae* Lindl в культуре *in vitro*», поскольку в данном разделе дан обзор работ по культивированию *in vitro* разных видов семейства имбирных, а не только *Amomum longiligulare* T.L. Wu.

2. В главе 3 есть фраза, что «для *A. tsao-ko* и *A. longiligulare* исследования в культуре *in vitro* ранее не проводились» (стр. 52), что не совсем так, так как известны отдельные работы по культуре тканей *A. longiligulare* (Rao et al., 2003; Dang et al., 2011).

3. Таблицы 3.8 «Различные виды обработки семян влияют на всхожесть семян пурпурного кардамона, выращенных *in vitro*» и 3.9 «Различные виды обработки семян влияют на рост проростков пурпурного амомуа после 80

суток культуры *in vitro*» корректней озаглавить «Влияние различных видов предварительной обработки на прорастание семян пурпурного кардамона *in vitro*» и «Влияние различных видов обработки семян на рост проростков пурпурного кардамона в культуре *in vitro*».

3. Не лишним будет добавить название вида для которого приводятся данные в название таблиц 3.5, 3.10, 4.2, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9.

4. Статистическая обработка данных по выживаемости растений через 3 месяца культивирования, представленных в таблице 4.4 (стр. 89), не показывает преимущества использования биогрунта фирмы Фаско. Фраза: «Через 3 месяца выращивания выживаемость микроклонов на биогрунте фирмы Фаско составила 48,9%, а при использовании грунта универсального фирмы Gardenstar – 41,1%, что на 16% меньше предыдущего варианта» (стр. 89) - не корректна. Кроме того, существенное уменьшение числа выживших растений через 3 месяца культивирования может говорить о том, что оба используемых субстрата не подходят для адаптации кардамона.

5. В качестве недостатков технического характера, присутствующих в работе, можно отметить некоторые опечатки и лексические неточности: корня (стр. 10), насекомых-хранителей (стр. 20), пазучных (стр. 29), ксловия (стр. 31), автора (стр. 94), сови (стр. 128), ротсту (стр.130), эингибирующий (стр. 157).

Отмеченные недостатки не имеют принципиального значения и не снижают ценности выполненной работы. Представленная работа актуальна, логически выстроена, её структура и содержание соответствуют цели и задачам исследования, выносимые на защиту положения достаточно обоснованы, результаты и выводы имеет практическую значимость.

**Заключение.** Несмотря на сделанные замечания, которые легко устранимы или носят дискуссионно-рекомендательный характер, следует заключить, что диссертационная работа Кхуат Ван Куэт выполнена автором самостоятельно на высоком методическом уровне и является законченной научно-квалификационной работой, которая отвечает требованиям ВАК РФ, с точки зрения актуальности, новизны и практической значимости полученных результатов предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа содержит совокупность научных результатов и положений, выдвигаемых для публичной защиты, и имеет внутреннее единство, а также свидетельствует о личном вкладе автора в науку. Предложенные автором

новые решения научно аргументированы и обоснованы. Выводы соответствуют полученным результатам экспериментов.

Результаты работы доложены и обсуждены на 4 международных и всероссийских конференциях, по результатам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 4 статьи в международных изданиях (Scopus и Web of Science). Автореферат диссертации в полной мере отражает ее основное содержание, а опубликованные работы раскрывают основные положения проведенного исследования.

Считаю, что по объему, методическому уровню выполненных исследований, новизне, актуальности, теоретической и практической ценности полученных результатов диссертационная работа Кхуат Ван Куэт на тему: «Биологические особенности размножения *in vitro* эндемичных видов *Атомит* ROXB. и изучение биологической активности их экзометаболитов», соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. 9-11, 13, 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 садоводства, биотехнологий  
и селекции сельскохозяйственных культур  
федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Мичуринский  
государственный аграрный университет»,  
кандидат биологических наук (2002 г),

 Муратова Светлана Александровна

26.05.2023 г

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Мичуринский государственный аграрный  
университет» (ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ), 393760, Тамбовская обл., г.  
Мичуринск, ул. Интернациональная, д. 101, телефон: 89092348708, e-mail:  
smuratova@yandex.ru

7

  
ДОСТОВЕРНОСТЬ ПОДПИСИ(ЕЙ)  
  
ЗАВЕРЯЮ.  
Ученый секретарь  
ФГБОУ ВО Мичуринский ГАУ  
 Е.Е. Попова