

О Т З Ы В
официального оппонента на диссертационную работу
Мазур Татьяны Васильевны
«Физиолого-биохимическая характеристика многоколосника
морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) в культуре
***in vitro*, его сомаклональная вариабельность с целью**
биотехнологического использования»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Соответствие диссертации специальностям и отрасли науки, по которым она представлена к защите.

Диссертационная работа Татьяны Васильевны Мазур выполнена на базе отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларусь» в рамках ГПОФИ «Ресурсы растительного и животного мира», тема 37 «Сохранение генофонда редких и хозяйственными ценных видов растений в коллекции *in vitro*. Разработка методов микроклонального размножения и депонирования лекарственных и декоративных культур», на 2006–2010 гг.; НП Республики Беларусь «Инновационные биотехнологии», тема 23 «Разработка способов сохранения генофонда лекарственных и пряно-ароматических растений в составе коллекций *in vitro* и их использования в качестве основы получения суспензионных культур биотехнологического назначения» на 2010–2012 гг.; ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологии», задание 1.15 «Структурные и регуляторные белки клетки и компартментов органелл как показатель физиологического состояния и уровней накопления вторичных метаболитов дедифференцированными тканями лекарственных растений» на 2011–2015 гг.; Гранта НАН Беларусь на выполнение научно-исследовательских работ «Разработка новой стратегии в биотехнологии получения вторичных метаболитов в культурах *in vitro* лекарственных растений на основе комбинации методов протеомики и метаболомики» на 2012–2014 гг.; ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологии» на 2016–2020 гг., задание 1.10 «Биохимические основы биогенного синтеза наночастиц металлов и селена в клетках растений и определение путей их практического использования».

Научный руководитель – заведующий отделом биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларусь», академик, доктор биологических наук, профессор Владимир Николаевич Решетников.

Представленные автором результаты многолетних комплексных исследований по выявлению физиолого-биохимических характеристик

Agastache rugosa (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze и его сомаклонов в культуре *in vitro* как продуцента биологически активных веществ, определению факторов различного генеза, обуславливающие повышенное накопление вторичных метаболитов каллусными клетками и разработка способов повышения биопродуктивности клеточных культур позволили получить сомаклоны и каллусные линии, а также суспензионные культуры, характеризующиеся повышенным содержанием метаболитов. На основании этих исследований соискателем научно обоснованы схемы введения в культуру *in vitro* лекарственного растения многоколосника морщинистого, предложено использование препарата с наночастицами селена и варьирование регуляторами роста в питательной среде для культивирования каллусных линий *A. Rugosa* как индукторов повышенного синтеза биологически активных веществ. Автором выявлено, что интенсивный синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит в стационарной фазе роста.

Таким образом, работа соответствует отрасли «биологические науки» и специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений согласно следующим пунктам Паспорта специальности ВАК Республики Беларусь от 13.12.2021 № 304:

3. Рост и морфогенез растений, типы роста, дифференциация и специализация тканей, запрограммированная клеточная гибель и аутофагия. Физиологические основы онтогенеза растений. Функционирование генома, координация и кооперация ядерного, пластидного и митохондриального геномов. Регуляция клеточного цикла.

4. Биохимические процессы в растениях. Структура и функция ферментов растений, регуляция их функций. Конформация белка и молекулярное моделирование. Состав, свойства и биологическая роль липидов, биосинтез липидов и его регуляция. Образование, превращение и роль в организме аминокислот и органических кислот. Принципы организации и функции в органеллах клетки нуклеиновых кислот, биосинтез и модификация ДНК, биохимическая организация, функционирование и реконструкция генома, регуляция его активности. Биохимия процессов репликации, транскрипции и трансляции генетической информации.

10. Гормональная регуляция роста и развития растений. Фитогормоны, их структура, биосинтез и функции. Негормональные регуляторы роста и развития растений. Регуляция роста и развития растений под действием экологических факторов и физиологически активных веществ. Процессы фотоморфогенеза и гравитропическая реакция.

15. Физиология культуры клеток и тканей *in vitro*, регенерации и клonalного микроразмножения растений.

17. Активные формы кислорода в растениях, их структура, синтез и функции. Патофизиологические процессы, вызываемые свободными

радикалами и окислителями. Антиоксидантная система растений. Системы репарации биополимеров.

18. Вторичный метаболизм. Процессы биосинтеза и физиологические функции вторичных метаболитов.

Актуальность темы диссертации.

Диссертационная работа Т.В. Мазур, связанная с возможностью выделения самоклонов и линий каллусных культур *A. Rugosa* с повышенным содержанием биологически активных веществ, а также суспензионных культур на их основе, востребована для получения препаратов вторичных метаболитов из биотехнологического сырья, позволяет решить проблему дефицита растительного сырья и сохранить в природе лекарственные растения, что определяет высокую степень ее актуальности. Полученные автором результаты многолетних комплексных исследований позволили научно обосновать пути повышения синтеза вторичных метаболитов в растении за счет отбора высокопродуктивных самоклонов и клеточных линий и оптимизации сред культивирования клеточных культур *A. Rugosa*.

Тема диссертационной работы Т.В. Мазур соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 гг., утвержденным Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 № 585 (пункт 3 «Физико-химические основы биологии. Биотехнологии, биологическая энергетика и биотопливо: 3.1. биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов»); приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг., утвержденным указом Президента Республики Беларусь №156 от 07.05.2020 г., пункту 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы».

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту.

Научные результаты диссертационной работы Т.В. Мазур и положения, выносимые на защиту, характеризуются существенной научной новизной в области физиологии и биохимии растений. Для реализации поставленной цели автором решен значительный спектр сложных научных задач с использованием оригинальных экспериментальных подходов, базирующихся на современных физиолого-биохимических методах, что позволило ему:

– впервые в Республике Беларусь получить сомаклоны *A. rugosa* и линии каллусных культур в качестве продуцентов биологически активных веществ

(БАВ) с повышенным их содержанием. Экспериментальные образцы каллусов *A. rugosa* послужили основой для получения суспензионных культур, использующихся для получения препаратов вторичных метаболитов из биотехнологического сырья.

– впервые подобрать модификаторы метаболизма БАВ клеточной культуры *A. rugosa* – препарат наночастиц селена и количественные сдвиги в составе регуляторов роста в питательной среде для культивирования, приводящие к индукции повышенного биосинтеза БАВ.

– впервые установить, что интенсивный синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит в стационарной фазе роста.

– впервые дать комплексную оценку физиолого-биохимическим показателям *A. rugosa* в культуре *in vitro* и *ex vitro*, что позволит расширить экспериментальную базу для развития работ в области биотехнологии культуры изолированных клеток и тканей лекарственных растений, включить клеточные культуры, *A. rugosa* и его сомаклоны в коллекционный фонд асептических культур государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларусь» и ДНК-банк интродуцентов.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Результаты исследований соискателя, приведенные в диссертационной работе, характеризуются высокой степенью достоверности, поскольку базируются на значительном объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных физиолого-биохимических методов. Автором проведена грамотная статистическая обработка экспериментальных данных. Все данные сопоставлялись с аналогичными исследованиями, приведенными в литературных источниках, и в полной мере позволили обосновать выводы и рекомендации диссертационного исследования.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.

Результаты диссертационного исследования Т.В. Мазур имеют важное фундаментальное, прикладное и социально-экономическое значение.

Основная научная значимость результатов диссертации, определяющая в перспективе практический и экономический результат – это то, что Т.В. Мазур установлены наиболее оптимальные среды для культивирования многоколосника морщинистого, позволяющие наиболее полно реализовать его морфогенетический потенциал и получить сомаклоны, каллусные и суспензионные культуры с повышенным содержанием биологически активных веществ.

Соискателем выявлено, что процесс адвентивного побегообразования у *A. rugosa* зависит от типа экспланта и соотношения гормонов группы цитокининов и ауксинов. Впервые получены сомаклоны *A. Rugosa*, проведен их метаболомный анализ, отобраны сомаклоны-гиперпродуценты БАВ фенольной природы стеблевого и листового происхождения. Получены каллусные культуры корневого, листового и стеблевого происхождения многоколосника морщинистого и его сомаклонов, установлена оптимальная среда для индукции каллусообразования на различных эксплантах. В результате сравнительного метаболомного анализа каллусов *A. rugosa* и каллусов сомаклонов выявлено, что максимальное количество накопленных БАВ обнаружено в листовых каллусах сомаклонов. Отмечено, что позитивный эффект – повышенное содержание фенольных веществ в целом сохраняется в длительнопассируемых (15-й пассаж) каллусах сомаклонов корневого, стеблевого и листового происхождения. Таким образом, автором обосновано получение каллусных культур с усиленным биосинтезом БАВ.

В ходе исследований Мазур Т.В. установлено, что препарат наноселена стимулировал биосинтез БАВ в каллусах *A. rugosa* стеблевого происхождения. Отмечено, что при варьировании гормональным составом среды культивирования повышается количество БАВ в каллусной культуре *A. Rugosa* относительно контроля. Получена суспензионная культура из каллусов стеблевого и листового происхождения многоколосника морщинистого, установлена продолжительность ростового цикла культуры на среде МС. Отмечено, что синтез фенольных соединений в клетках суспензионной культуры *A. rugosa* происходит на всех этапах роста культуры и достигает максимума на 17 сутки культивирования.

Полученные Мазур Т.В. результаты будут использованы для создания базы данных, которая может быть применена при идентификации *A. rugosa* в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

Таким образом, результаты столь многоплановых глубоких исследований автора более чем за десятилетний период внесут существенный вклад в теорию и практику биотехнологии культуры изолированных клеток и тканей лекарственных растений.

Полученные результаты по методам введения в культуру *in vitro* многоколосника морщинистого и подходам его культивирования являются перспективными для получения значительного объема растительного сырья для фармацевтической промышленности. Данные Мазур Т.В. явились основой для разработки регламентов получения биологически активных веществ фенольной природы из клеточных культур лекарственного растения многоколосника морщинистого и на получение суспензионной культуры *A rugosa*. Их использование позволит получать биотехнологическое сырье для изготовления иммуномодулирующих препаратов, антисептиков, препаратов

для лечения и профилактики заболеваний печени. Подобранные модификаторы метаболизма могут использоваться для регуляции биосинтеза вторичных метаболитов при биотехнологическом производстве, способствуя повышению объема производимой продукции и как следствие снижая расходы, что определяет социально-экономическую значимость работы.

Результаты диссертационной работы по многоколоснику морщинистому, его сомаклонам и каллусам введены в коллекцию асептических культур хозяйственно полезных растений Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларусь, включённую в государственный реестр ботанических коллекций. Кроме того, материалы диссертационного исследования используются в образовательном процессе филиала кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений Белорусского государственного университета, а также внедрены в учебный процесс студентов факультета естествознания Белорусского государственного педагогического университета имени Максима Танка.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати.

В соответствии с требованиями ВАК РБ, основные положения и научные результаты соискателя, выносимые на защиту, опубликованы в полном объеме и отражены с достаточной полнотой освещения в 21 научной работе, в том числе в 1 коллективной монографии, а также в значительном количестве научных статей в периодических и других изданиях, в том числе в 3-х работах из обязательного перечня ВАК РБ, 3 в зарубежных рецензируемых научных изданиях и 9 в сборниках научных трудов и материалов конференций, 5 тезисах докладов.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК Республики Беларусь.

Концептуальная основа работы соответствует цели и задачам исследований и отчетливо прослеживается в содержании всех ее разделов, логично увязанных между собой. Стиль изложения безукоризненный, иллюстрационный материал – четкий, хорошо воспринимаемый. Поэтому оформление диссертации и автореферата соответствует требованиям действующей Инструкции ВАК РБ.

Диссертация Т.В. Мазур состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, включающей 4 главы, заключения и библиографического списка из 179 наименований, 140 из которых на иностранных языках, а также списка публикаций соискателя, включающего 21 наименование.

Общий объем опубликованных материалов составляет 3,7 а.л., из которых лично автору принадлежит 2,2 а.л. В изданиях из перечня ВАК РБ – 2,1 а.л., из которых лично автору принадлежит 1,4 а.л. Общий объем работы (с приложениями) составляет 147 страниц компьютерного текста, содержит 15

таблиц, 36 рисунков, 9 приложений, включающих 2 лабораторных регламента, 2 Акта внедрения и 4 акта о практическом использовании результатов исследований.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.

Выполненные автором оригинальные исследования в области физиологии и биохимии растений с использованием ее современной методологии, связанные с введением в культуру *in vitro Agastache rugosa*, его сомаклонов, каллусных и суспензионных культур, описанием морфогенетического и биохимического его потенциала, выявлением способов модификации метаболизма, направленных на повышение биосинтеза вторичных метаболитов, имеют важное фундаментальное и прикладное значение.

Рассмотренные выше результаты исследования, их статистическая обработка и интерпретация, позволяют считать, что научная квалификация Мазур Татьяны Васильевны соответствует искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «физиология и биохимия растений».

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Теоретические и практические результаты исследований должны более широко войти в образовательный процесс вузов биологического профиля, а также быть более активно задействованы как источник природно-сырьевой базы для фармацевтической промышленности.

Замечания в адрес диссертационной работы.

Серьезных замечаний принципиального характера по содержанию и оформлению диссертационной работы и автореферата не имеется. Однако при рассмотрении диссертации Мазур Т.В. возникли отдельные замечания и пожелания, не снижающие в целом высокой оценки работы:

1. В методах исследования в пункте 2.2.2 на стр. 39 не верно указана ссылка по окраске жизнеспособных клеток. Жизнеспособность клеток с использованием нейтрального красного оценивается знаком «+» в случае не окраски цитоплазмы клеток.

2. В пункте 2.2.3 при расчете экономического коэффициента в формуле утеряно его обозначение.

3. Требуется уточнение по отдельным методическим вопросам:

а) в п. 2.2.7 и 2.2.8 – необходимо уточнить процент раствора этанола, входящего в состав контрольного раствора, а не экстракта;

б) в п. 2.2.9 необходимо уточнить размерность единиц, в которых исчисляется сумма флавоноидов, что затрудняет интерпретацию результатов, отраженных на рисунках 4.6, 4.7, 4.9.

в) в п.2.2.17 уточнить содержание компонентов в контрольной пробирке при определении активности пероксидазы.

4. Досадным упущением автора является то, что при анализе полученных результатов в целом ряде случаев (стр. 57 и др.) не сравнивается на сколько % отклоняются полученные показатели от контрольных значений, а даются только их реальные значения. Кроме того, на стр. 79, где обсуждается содержанием БАВ в корневом и листовом каллусе и не понятно, какой вариант служил контролем для сравнения.

5. Не ясны обозначения по оси абсцисс на рисунке 3.9 на стр. 61, так как из обсуждения результатов и согласно ссылке на этот рисунок должны быть среды 9–12.

6. Несмотря на хороший академичный стиль изложения и серьезный анализ представленных в работе результатов исследований, к сожалению, в тексте диссертации и автореферата местами встречаются орфографические ошибки, описки, стилистические погрешности и нарушения правил пунктуации.

Тем не менее, высказанные замечания никоим образом не умаляют высокой значимости и достоинств представленной к защите работы в целом. Диссертация Мазур Татьяны Васильевны «Физиолого-биохимическая характеристика многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et C.A. Mey.) Kuntze) в культуре *in vitro*, его сомаклональная вариабельность с целью биотехнологического использования» соответствует специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений и отвечает требованиям, установленным главой З Положения ВАК Республики Беларусь о присуждении ученых степеней.

Научные результаты, за которые соискатель может быть присуждена ученая степень.

Ученую степень кандидата биологических наук Мазур Татьяне Васильевне следует присудить за новые научные и практические результаты, полученные в ходе многолетних комплексных исследований в области физиологии и биохимии растений, включающие:

разработку схемы введения в культуру *in vitro* многоколосника морщинистого и метода его культивирования; изучение морфогенетического потенциала многоколосника морщинистого и выявление типа экспланта и соотношения гормонов группы цитокининов и ауксинов, определяющего повышение адвентивного побегообразования;

впервые полученные сомаклоны *A. rugosa* и проведенный метаболомный анализ *A. rugosa* и его сомаклонов, отобранные сомаклоны-гиперпродуценты биологически активных веществ фенольной природы;

за научное обоснование способов получения каллусных культур корневого, листового и стеблевого происхождения многоколосника морщинистого и его сомаклонов, определение оптимальных сред для

индукции каллусообразования, проведение сравнительного метаболомного анализа каллусов *A. rugosa* и каллусов сомаклонов и получение каллусных культур с усиленным синтезом БАВ, а также получение суспензионной культуры *A. rugosa* и оценку ее продуктивного потенциала;

за выявление модификаторов метаболизма (среды, содержащий препарат наноселен и варьирование гормональным составом среды культивирования) и разработку способов направленной регуляции усиленного синтеза биологически активных веществ клеточными культурами *A. rugosa*. Это будет востребовано для получения препаратов вторичных метаболитов из биотехнологического сырья, позволит решить проблему дефицита растительного сырья и сохранить в природе лекарственные растения.

Выражаю свое согласие на размещение отзыва о диссертации на официальном сайте государственного научного учреждения «Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларусь» в глобальной компьютерной сети Интернет.

15 сентября 2023 г.

Официальный оппонент:

Доцент кафедры биологии
и методики преподавания биологии
УО «Белорусский государственный
педагогический университет имени М. Танка»,
кандидат биологических наук, доцент

Ж.Э.Мазец

