

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию
Мартиросьяна Левона Юрьевича

«Биотехнологические аспекты получения новых форм каучуконоса *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и разработка условий их аэропонного культивирования» по специальности 1.5.6 – Биотехнология, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, выполненную в лаборатории биохимической физики и инженерии метаболизма растений ФГБУН Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

1. Актуальность избранной темы

Диссертация посвящена исследованию морфогенетического, физиолого-биохимического и адаптационного потенциалов перспективных форм *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin при влиянии стрессоров абиотической и биотической природы и использовании различных подходов для разработки биотехнологической системы получения и массового размножения растений кок-сагыза – источника ценных целевых растительных продуктов.

Натуральный каучук всегда привлекал внимание к себе уникальностью физических свойств, такими как высокой эластичностью, прочностью на разрыв и истирание, хорошей водостойкостью и электроизоляционными качествами. Все это делает его незаменимым в производстве шин, медицинских изделий и многих других продуктов. Вместе с тем натуральный каучук является возобновляемым и биоразлагаемым ресурсом, что значительно повышает его экологическую ценность. Несмотря на производство синтетических аналогов по сей день во всем мире интерес к этому продукту достаточно большой. Основным источником натурального каучука по настоящее время остается гевея бразильская, однако высокая эпифитотийность разнообразных патогенов практически свело к нулю культивирование данного растения в традиционных странах ее выращивания. Основным поставщиком натурального каучука сегодня является Юго-Восточная Азия.

Еще во времена СССР в 30-50 годы прошлого столетия появился огромный интерес к различным каучуконосам. Различные виды растений активно и комплексно изучали. Кок-сагыз стал возделываемой промышленной культурой, его выращивали в Московской и Ленинградской областях, а также в Белорусской ССР. Однако в силу политических изменений, низкой эффективности получения конечного продукта, дальнейшее культивирование этого растения прекратилось. Однако уже сегодня на мировом рынке работают ряд компаний, занимающихся исследованиями кок-сагыза, выращивают его и производят новую продукцию. При выращивании в полевых условиях получают до 960 кг/га каучука в год.

Мартиросян Л.Ю. в своей работе предлагает современные подходы к анализу исследуемого растительного материала *T. kok-saghyz* как по регенерационной способности, так и подверженности воздействию фитопатогенов, разработке методик оздоровления растений, получения культуры «*hairy roots*», осуществлению генетической трансформации корней кок-сагыза, полиплоидизации растений, выращиванию в культуре *in vitro* и аэропонном фитотроне с оценкой продуктивности по каучуку и инулину

В настоящее время в рамках развития национального проекта Биозкономика именно изучению и рациональному использованию растительных ресурсов в нашей стране уделяется первостепенное значение.

По сути своей представленная к защите диссертационная работа абсолютно вписывается в стратегию данного нацпроекта, и может быть одним из элементов стратегии биобезопасности РФ.

В связи вышеизложенным диссертация Л.Ю. Мартиросяна «Биотехнологические аспекты получения новых форм каучуконоса *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и разработка условий их аэропонного культивирования» несомненно является актуальной.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации Л.Ю. Мартиросяна, определяется определенной структурированностью исследования. Автор последовательно выполняет эксперименты: создает, прежде всего, рабочую коллекцию растений *T. kok-saghyz*; исследует их патогенную эндофлору, осуществляет элиминацию выделенных и идентифицированных бактериальных патогенов; вводит кок-сагыз в культуру *in vitro*, отрабатывает методику генетической трансформации корней и полиплоидизации растений; изучает рост и развитие растений в аэропонном фитотроне, специально разработанном под культивирование данного вида растений; исследует влияние спектра света, его интенсивность, концентрации CO₂, минерального состава питательных растворов на повышения выхода как самих корней, так и самих целевых продуктов (натурального каучука и инулина). Выводы, сделанные автором, соответствуют поставленным цели и задачам. Научные положения, сформулированные в работе, являются обоснованными.

Обоснованность научных положений и выводов подтверждена апробацией результатов исследований на 11 всероссийских и международных конференциях разного уровня, отражением основных результатов диссертации в опубликованных автором научных статьях, защищенных и полученных патентах и т.д. Результаты диссертационной работы, ее основные положения, идеи и выводы нашли отражение в 19 научных трудах, в том числе в шести статьях в научных изданиях, рекомендованных ВАК, в двух патентах на изобретение и в двух патентах на полезную модель.

3. Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Исследование, проведенное Л.Ю. Мартиросяном, выполнено на высоком методическом уровне, полученные результаты и выводы оригинальны.

Новизна работы не вызывает сомнения. На основе изучения научной литературы автор подобрал и использовал ряд методик и методов. Значительная часть методик, используемых для анализа растительного материала *T. kok-saghyz* и улучшающих его качественные и количественные характеристики применяется впервые, часть – разработаны или модифицированы самим автором непосредственно в преломлении к целевому растительному объекту – кок-согызу.

Достоверность результатов исследования и сформулированных на их основе положений обеспечена использованием современных методов биотехнологии,

генетической инженерии, физиологии, биохимии и биофизики растений, статистической обработки данных, дисперсионного анализа, апостериорного теста (метода множественных сравнений) – Критерия Дункана для определения значимости (ранжирования) различий между средними значениями нескольких групп после выявления самих различий.

Так, впервые комплексно изучены образцы, полученные из ВИРа и Казахстана как в условиях *in vitro*, так и при выращивании на аэропном фитотроне. Показаны регенерационный ответ различных первичных эксплантов на воздействие регуляторов роста и глутатиона и дальнейшая реализация морфогенетического потенциала по пути каллусо- и морфогенеза. Идентифицирован состав выделенных диссертантом эндогенных фитопатогенов (*Pseudomonas putida*, *Raoultera terrigena*) ограничивающий потенциал исследуемых образцов, представлены подходы к оздоровлению растений и разработаны приемы элиминации бактериальной инфекции с помощью антибиотиков и бактериофагов. Подобран состав питательных элементов, спектральный состав света и интенсивность освещения, обеспечивающие повышение синтеза натурального каучука и инулина в корнях кок-сагыза. Проведена агробактериальная трансформация отобранных образцов кок-сагыза, способствующая получению «hairy roots». Осуществлена полиплоидизация с использованием колхицина. Методом проточной цитометрии, кариологического анализа и оценки морфометрических и анатомических показателей выделены перспективные растения для дальнейшей селекции и выращивания в специализированных фитотронах. Предложена периодическая срезка корней кок-сагыза со специальной дезинфекцией поверхности зоны поранения, повышающая продуктивность и выход натурального каучука и инулина. Применение отдельных химико-физических методов в процессе анализа растений кок-сагыза впервые позволил определить качественный состав каучука, установив его схожесть с каучуком, получаемым из гевеи бразильской. Разработанные патенты обеспечат полноценный и эффективный рост ценных образцов в аэропном фитотроне и выход имеющего высокий спрос целевого продукта.

Результаты и выводы представленной на соискание работы создают базу для еще больших научных исследований в области изучения и селекции ценных каучуконосных растений в искусственных условиях выращивания и разработки технологии дальнейшего масштабирования ценной культуры кок-сагыза.

4. Значимость результатов, полученных автором, для науки и практики

Теоретическая значимость полученных результатов состоит в развитии положений по совершенствованию процессов культивирования кок-сагыза, а именно раскрытию потенциала перспективных растительных образцов в различных системах выращивания. Показано, что корни кок-сагыза обладают разной чувствительностью к минеральному питанию, качественным и количественным показателям света, воздействию антимикротрубчатых соединений с целью их полиплоидизации, реакцией на агробактериальную трансформацию и выходом таких важных компонентов как каучук и инулин. На основе проведенных исследований представлены основные пути элиминации бактериальных инфекций, вызванных специфическими фитопатогенами.

Практическая значимость результатов заключается в возможности их использования при разработке теории и технологии массового аэропного выращивания растений кок-сагыза и возможно других каучуконосов в фитотроне, включая непрерывное взвешивание

и анализ содержания натурального каучука в корнях без проведения традиционных биохимических исследований, что повысит эффективность культивирования целевых растительных объектов и получение ценных продуктов для медицины, пищевой промышленности, строительства, машиностроения и др.

Результаты диссертации могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам: «Биотехнология и культивирование биообъектов», «Химия окружающей среды», «Физико-химические методы в анализе хозяйственно-ценных растений», «Биоэкономика», а также при подготовке курсовых и дипломных работ.

5. Оценка содержания диссертации и ее завершенность

Диссертация Л.Ю. Мартиросяна «Биотехнологические аспекты получения новых форм каучуконоса *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и разработка условий их аэропонного культивирования» состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списков используемых сокращений и терминов, списка литературы и одного приложения.

Введение построено в соответствии с общими требованиями и включает обоснование актуальности темы диссертации, цель и задачи работы, научную новизну и практическую значимость, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробацию результатов, личный вклад автора в проведенные исследования, сведения о публикациях, а также об объеме и структуре диссертации.

Глава 1 состоит из семи подразделов. В ней представлены литературные данные о натуральном каучуке, его свойствах, основных источниках, проблемах их дефицита и использовании в различных сферах. Рассматриваются преимущества натурального каучука перед синтетическими аналогами. Литературный обзор содержит информацию об объекте исследования *T. kok-saghyz*, физиолого-биохимических особенностях, вопросах биосинтеза натурального каучука и инулина, сообщениях о выявленных ранее патогенах, поражающих кок-сагыз и о влиянии элементов питания на его морфогенез. Представлены единичные публикации о генетических особенностях растения, информация о проведении селекционной работы путем отбора или полиплоидизации на территории СССР и уже в наше время на территории РФ, отдельные успешные результаты ученых из Казахстана по клональному микороразмножению кок-сагыза. Есть результативность агробактериальной трансформации у коллег из Китая с эффективностью трансформации до 25 %. Автором отмечено, что постоянно совершенствуются методы выделения натурального каучука из исходных растений с оценкой качественного и количественного состава (гравиметрический, различные варианты ИК-спектроскопии). Описаны результаты влияния спектрального состава света, CO₂ на рост и развитие растений в целом, их фотосинтетическую активность. Также рассматриваются различные фитотронные технологии, применяемые на растениях, указаны преимущества и недостатки такого типа выращивания растений. Показана значимость и перспективы культивирования ценных каучуконосов. При написании литературного обзора автор руководствовался общим планом построения диссертации. Имеющиеся данные позволяют спланировать и обосновать проводимые автором исследования.

Глава 2 состоит из девяти подразделов. В главе (материалы и методы) описан исходный растительный материал кок-сагыза и процесс создания его рабочей коллекции. Автор досконально описывает разработанный им с коллегами аэропонный фитотрон,

насыщенный аналитическими инструментами, в котором проводились все основные эксперименты по культивированию растений, подбор питательного раствора, разработанное непосредственно учеными устройство для измерения массы растений в режиме реального времени, представлены этапы исследования влияния спектрального состава света, CO₂-газообмена, переменной флуоресценции на физиолого-биохимические процессы и биосинтез каучука и инулина. Отражен количественный анализ глюкозы и сахарозы в листьях кок-сагыза. Представлен процесс выделения и различных способов идентификации бактериальных патогенов, валидации патогенности выделенных бактерий, способы элиминации фитопатогенов. Расписаны эксперименты культивирования кок-сагыза в условиях *in vitro*, включая каллусогенез и регенерацию растений, подробно описанную агробактериальную трансформацию, изучение характеристик роста бородачатых корней («hairy roots»), получение из них регенерантов, осуществление полиплоидизации семян и каллуса, анализ пloidности различными способами (проточная цитометрия, подсчет хромосом на давленных препаратах), подсчет хлоропластов в замыкающих клетках устьиц. Наряду с этим представлен метод периодической срезки корней, выделения из них инулина и натурального каучука методами кислотного гидролиза, гравиметрически. Несомненно, интересно применение разрабатываемого автором метода количественного определения содержания натурального каучука в растениях с помощью электронного парамагнитного резонансного спектрометра (ЭПР спинного зонда). Для исследования образцов натурального каучука из корней кок-сагыза использовали метод ИК-спектроскопии. Вместе с тем для определения молекулярной массы натурального каучука был применен метод гельпроникающей хроматографии. Автор свободно владеет компьютерными методами обработки и анализа изображения, статистическими методами обработки данных.

Глава 3 состоит из девяти подразделов. В главе (результаты и обсуждения) представлены результаты подбора линий кок-сагыза, полученные из ВИР (Санкт-Петербург) и Казахстана, для дальнейших исследований, выявлена роль регуляторов роста в процессе каллуса и морфогенеза (как на этапе *in vitro* регенерации, так и ризогенеза) выделенных ранее образцов. Показана антиоксидантная роль глутатиона и определена его оптимальная концентрация (1 мМ). Подробно расписаны результаты оздоровления кок-сагыза, включающие в себя идентификацию фитопатогенов путем биохимических тестов и методом ПЦР анализа образцов. Выявлено два вида бактерий *Pseudomonas putida* и *Raoultella terrigena* обладающих высокой степенью инфицированности целевого растительного объекта. Сделан вывод о том, что эти бактерии являются основной причиной дефолиации растений в процессе их выращивания. Определены наиболее эффективные антибиотики и их сочетания (цефоперазон и сульбактам; колистин) заметно повышающие процент оздоровленных растений до 88 и 80%, соответственно. Использование смеси бактериофагов в концентрации 10⁹ БОЕ/л (бляшкообразующая единица) снижало до 0 инфицированность регенерантов. Изучение отдельных параметров минерального питания при выращивании в аэропонном фитотроне показало что рост растений значительно улучшался при дополнительном внесении азота, нитрата магния и йода. На содержание каучука оказывали влияние азот, калий и цинк. Инулин лучше синтезировался в присутствии йода, серебра и нитрата магния. Важно, что полученные результаты сопоставимы с результатами других ученых, работающих на других образцах кок-сагыза. Получены довольно интересные результаты по изучению

работы фотосинтетического аппарата выделенных образцов и CO₂-газообмена на содержание целевых веществ. Вместе с тем проанализирована активность фотосинтетического аппарата в зависимости от спектрального состава и интенсивности освещения. Показано, что повышение накопления каучука почти в 1,75 раза связано с увеличением доли синего света в спектре облучения, при этом наблюдалось также накопление в корнях инулина в 1,17 раз превышающее при других условиях выращивания. Эффективность проведенной агробактериальной трансформации достигла 14%. Изучен рост бородатых корней кок-сагыза и накопление в них каучука и инулина. Получены композитные растения с фенотипом бородатых корней. Несомненно, важной составляющей в оценке эффективности полиплоидизации является уровень пloidности и морфологических параметров полученных растений. Среди исследованных были идентифицированы 28 образцов тетраплоидов, 4 – триплоида, 6 – миксоплоидов 3n-4n, 3 – миксоплоида 5n-6n и один гексаплоид. Кариологический анализ подтвердил эти результаты. Проведен биохимический анализ полиплоидов. Увеличение продуктивности кок-сагыза (в два раза) обеспечивал новый подход в выращивании растений в аэропонтном фитотроне, включающем в себя также периодическую срезку корней. С помощью гелпроникающей хроматографии и ИК-спектроскопии изучен качественный состав каучука, выделенного из корней кок-сагыза. Значимые результаты представлены на графиках и в таблицах.

Заключение объединило в себе все полученные результаты и подвело к основным стратегическим задачам для дальнейших исследований и перспективам улучшения переработки целевого продукта.

Экспериментальная глава написана научным языком, материал изложен логично, четко, иногда излишне подробно.

В конце работы автор делает 11 **выводов**, которые отражают полученные результаты в процессе раскрытия цели и решения задач исследования. Список сокращений и список терминов делает восприятие текста диссертации более удобным.

Список литературы обширен, включает 354 источника, в том числе 247 источников на иностранном языке и 214 – за последние десять лет. В представленном списке в основном это ссылки на статьи в научных журналах (281 источник) и на монографии, учебники и методические пособия (42 источника).

В **приложение** помещены технические характеристики аэропонтного фитотрона.

Диссертация изложена на 252 страницах, содержит 30 таблиц и 56 рисунков. Иллюстративный материал хорошего качества и раскрывает и подтверждает результаты проведенных исследований. При изложении материала автор ссылается на рисунки и таблицы.

В целом диссертация представляет собой завершенное научное исследование.

6. Отметить достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, высказать мнение о научной работе соискателя в целом.

Достоинство работы заключается в следующем:

Достоинством литературного обзора является, то, что автор использовал довольно большое количество иностранной литературы, а также цитировал работы ведущих российских исследователей занимавшихся или занимающихся вопросами изучения и выращивания *T. kok-saghyz* и основных целевых продуктов его переработки.

Предложенные методики освещены полно, подробно, имеется возможность корректного восприятия экспериментов другими исследователями.

Все достоинства главы результаты и обсуждения изложены мною в предыдущем пункте (п. 5) отзыва.

Представляет особый интерес разработанный автором совместно с его коллегами аэропонный фитотрон, который соискатель использует в своих исследованиях. Имеются запатентованные способ аэропонного выращивания каучуконосного растения кок-сагыз, а также способ определения содержания каучука в тканях каучуконосных растений. Несомненно, найдет свое применение сконструированное автором с коллегами устройство для измерения веса растений в фитотроне в режиме реального времени.

В целом многое автором сделано впервые и радует, что Л.Ю. Мартиросян ищет нетрадиционные подходы, которые вполне могут на каком-то этапе ускорить и облегчить анализ исследуемых растительных объектов.

Необходимо сделать следующие **замечания**:

Цель исследования сформулирована достаточно широко. Данная формулировка цели не дает четкого представления о том, относится ли диссертационная работа к фундаментальным или прикладным исследованиям.

В задаче 1 стоило уточнить о каких фитопатогенах идет речь, ведь судя из диссертации, вся работа была направлена на элиминацию выделенной и идентифицированной автором бактериальной инфекции. Кроме того, обычно количество выводов должно соответствовать количеству поставленных задач, или незначительно превышать их.

Когда знакомишься с диссертацией в целом, понимаешь, что наряду с глубокими фундаментальными исследованиями работа все-таки имеет практическую направленность, поэтому и отсутствуют практические рекомендации. Во введении стоило разделить научную новизну и практическую значимость, добавив к ней по требованию к оформлению диссертации теоретическую значимость.

Не совсем ясно из главы материалы и методы в какой период времени (года) высевал семена кок-сагыза в поселке Горки Ленинские. От этого зависит прорастание семян и развитие растений. В тексте главы нет ссылки на Рисунок 2.5.

В разделе 2.3, а затем и в главе 3 появляется термин «асептизация». Если вы говорите о растительных объектах и получении асептической культуры, то есть общепринятые термины – стерилизация, дезинфекция, но в любом случае не асептизация. Затем по тексту появляется термин «асептизированные корни» (страницы 72, 73, 81, 82, 88, 109). Здесь также стоит пересмотреть название.

И опять терминология: не «грибковая инфекция», а грибная, не «микрклональное размножение», а клональное микроразмножение.

В подразделе 2.6., касающегося вопросов полиплоидизации речь идет о применении колхицина. Колхицин это низкомолекулярное вещество, влияющее на тубулин. Термин «антимитотик» к колхицину не совсем корректен, здесь уместно применить термин «антимикротрубочковое соединение». К таким соединениям относится оризалин, трифлюролин, амипрофосметил. Разница между ними и колхицином, то что последний способствует получению одновременно три-, тетра-, гексаплоидов, и разнообразие миксоплоидов.

Практически во всех рисунках, где есть фотографии кок-сагыза культивируемого в условиях *in vitro* или фитотрона не указан масштаб, а он нужен для правильной визуализации объекта исследования. Это и касается снимков бактерий. Было бы неплохо часть фотографий объединить для наглядности процессов каллусообразования и регенерации.

Часть таблиц выходит за рамки требуемых полей (Таблица 2.3, 3.2, 3.10, 3.12, 3.13, 3.23, 3.30, 3.33). В таблицах, чаще всего, представлен средний показатель по исследуемым растениям, однако следовало бы указать от какого это исходного образца. Их было отобрано изначально 3-4 и у них содержание натурального каучука и инулина все-таки было различно.

Единицы измерения должны быть представлены по тексту диссертации в одном формате, например мкМ, но тогда не надо писать μM .

В конце работы есть список сокращений и список терминов. Это очень хорошо. Но по требованиям к оформлению диссертаций сокращения не должны быть в названиях глав, подразделов и других более мелких названий, соответственно это требование перетекает в содержание диссертационной работы.

Приложение должно нумероваться литерными буквами русского алфавита. Пример: Приложение А. Если есть рисунки или таблицы, то они соответственно нумеруются цифрой после литерной буквы.

Выводы адекватно отражают полученные результаты и соответствуют поставленной цели, имеют аннотационный характер.

На мой взгляд, работа очень объемна и ее можно было сократить, перенеся ссылки на литературу по тексту диссертации в цифры. Однако для оппонента работа с текстом намного удобней, когда ты видишь ссылки на авторов и год.

Указанные недостатки и замечания не снижают высокого научного уровня и практической значимости выполненного исследования.

7. Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

Диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно. В работе приведены научные результаты, позволяющие ее квалифицировать как разработку научно обоснованных технических решений, внедрение которых может внести значительный вклад в решение, как важнейших социальных задач, так и ускорить экономический рост и биобезопасность Российской Федерации. Диссертация представляет собой завершенную научно-исследовательскую работу на актуальную тему. Новые научные результаты, полученные Л.Ю. Мартиросяном, имеют существенное значение для российской науки и практики в области биоэкономики, в частности, биотехнологии каучуконосов. Работа базируется на достаточном числе исходных данных, примеров и расчетов. Написана она доходчиво и грамотно. В заключение каждой главы есть четкие выводы. Выводы обоснованы.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Таким образом, диссертация «Биотехнологические аспекты получения новых форм каучуконоса *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и разработка условий их аэропонного культивирования» является научно-квалификационной работой, по новизне, актуальности, объему выполненных исследований и практической значимости, достоверности

полученных результатов соответствует требованиям пункту 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор – Мартirosян Левон Юрьевич, заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Официальный оппонент
Главный научный сотрудник,
заведующая научно-исследовательским
отделом экспериментальной биологии и
патологии растений Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина
Российской академии наук
улица Ботаническая, д. 4, г. Москва, 127276
irimitrofanova@yandex.ru
+79788438523

доктор биологических наук по специальности
03.00.20 соответствует специальности 03.01.06 –
Биотехнология (биологические науки)
член-корреспондент РАН

Митрофанова Ирина Вячеславовна

02.09.2025 г.

Подпись *Митрофановой И.В.* заверяю
Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина
Российской академии наук
Митрофанова

