

**ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Комиссарова Никиты Сергеевича
на тему: «ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ МАКРОМИЦЕТОВ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР»
по специальности 1.5.18 Микология**

Диссертационная работа Никиты Сергеевича Комиссарова посвящена изучению культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей штаммов макромицетов из различных эколого-таксономических групп при использовании различных методов их хранения. Данное исследование лежит в области использования современных методов сохранения биоразнообразия грибов *ex situ*, а именно в чрезвычайно актуальном направлении по разработке и тестированию методов долгосрочного сохранения чистых культур (штаммов) макромицетов в коллекциях с сохранением их чистоты, жизнеспособности, генетической стабильности и физиологической активности. С каждым годом штаммы съедобных, лекарственных и промышленно значимых видов макромицетов играют все большую роль в научных исследованиях и практических разработках в биотехнологии, физиологии и биохимии грибов и других областях, связанных с изучением и использованием грибов. Важное значение имеет также сохранение в коллекциях штаммов редких и исчезающих видов макромицетов для возможности их последующего возвращения в природные местообитания. В этой связи **актуальность избранной темы не вызывает сомнений. Проведенное исследование весьма актуально** как для специализированных коллекций культур, так и для рабочих исследовательских коллекций, а также для всех пользователей промышленных штаммов-продуцентов пищевой биомассы или биологически активных веществ. Потеря жизнеспособности штаммов или их так называемое «вырождение», выражающееся в изменении морфологических, ростовых и биосинтетических характеристик при долгосрочном хранении в

коллекционном фонде или длительном использовании в научных или практических целях, вызывает большие проблемы.

Сформулированные автором **Цель и Задачи** исследования способствуют решению этих проблем. В работе изучено влияние различных методов хранения чистых культур макромицетов на комплекс морфолого-культуральных признаков и физиологические характеристики вегетативного мицелия. При этом лично автором выделено значительное количество новых штаммов макромицетов широкого таксономического разнообразия и географического охвата и создана рабочая коллекция штаммов. Штаммы этой коллекции и явились **Объектами исследования**, в ходе которого было изучено влияние различных методов хранения, различных криопротекторов и субстратов-носителей в протоколах криохранения на жизнеспособность и морфолого-культуральные характеристики штаммов, а также влияние различных методов хранения на эндоглиюканазную активность штаммов.

Научная новизна работы заключается в том, что ранее таких целенаправленных исследований и в таком объеме на штаммах макромицетов не проводилось. Впервые были получены новые данные о влиянии различных методов хранения, субстрат-носителей и криопротекторов на морфологию и физиологию мицелия отобранных видов макромицетов. Впервые показано, что способность штаммов сохранять физиологическую и биохимическую активность в процессе хранения зависит от эколого-трофической принадлежности штаммов. Впервые были выявлены виды, способные сохранять свою жизнеспособность после 8 месячного хранения в сублимированном состоянии. Впервые получены сравнительные данные об эндоглиюканазной активности после хранения различными методами для 17 штаммов макромицетов. **Достоверность** результатов исследования обусловлена большим числом проведенных экспериментов с достаточным количеством повторностей в каждом из них, статистическим анализом полученных данных и публикацией научных статей в рецензируемых журналах. **Личный вклад автора** не вызывает сомнений – все этапы

экспериментальной работы и анализа полученных результатов выполнены диссертантом самостоятельно, включая написание статей и тезисов, представление результатов работы на конференциях, получение чистых культур из природных образцов макромицетов, поддержание и расширение коллекции чистых культур.

На основании анализа полученных в работе данных выявлено влияние используемых в микологических коллекциях и модифицированных автором методов хранения на ряд морфолого-физиологических и биохимических характеристик штаммов, а также эндогликанызную активность штаммов макромицетов, что составляет **теоретическую значимость** работы. К **практической значимости** можно отнести разработанные автором модификации методов криохранения, которые могут быть использованы в учебных, исследовательских и промышленных коллекциях штаммов. Также была значительно увеличена коллекция штаммов макромицетов кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ, которая является базой для научных и научно-педагогических работ сотрудников и студентов не только этой и других кафедр биофака МГУ, но и более широкого круга пользователей.

Обоснованность положений, выносимых на защиту, научных выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, позволяет принять за основу разработанные протоколы и выявленные закономерности для дальнейших исследований в этом направлении с привлечением штаммов более широкого таксономического и эколого-трофического разнообразия, в том числе и культур эктомикоризных видов. Эта группа грибов не была вовлечена в исследование в данной работе, однако долгосрочное сохранение штаммов ЭМГ представляет большую проблему и является крайне актуальным.

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 5 — статьи в журналах, индексируемых РИНЦ и Scopus, и 3 — тезисы и

материалы конференций, на которых полученные результаты были доложены и прошли **апробацию**.

Диссертация традиционно структурирована и представляет собой рукопись, изложенную на 135 страницах и состоящую из введения, 3 глав (включающих обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения), заключения, выводов, благодарностей, списка литературы из 259 работ (включая 235 зарубежных) и 5 приложений. Текст диссертации иллюстрирован 40 рисунками и 21 таблицей.

Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации и хорошо иллюстрирован.

Во **Введении** автор уделяет внимание понятию «макромицеты» и их полезным свойствам с представлением литературных данных по исследованным видам, проявляемым биологическим активностям, наличию и содержанию биологически активных соединений. Представлена также обязательная информация о цели работы, задачах, объектах исследования, научной новизне и другая, традиционно отражаемая во введении.

Несколько удивило решение автора представить достаточно обширную информацию о биологической активности макромицетов и их полезных свойствах с обильным цитированием именно во введении. По объему это заняло почти половину всего введения и, вероятно, было бы более уместно поместить эту информацию самостоятельным разделом в Обзор литературы.

В **Обзоре литературы** собран и проанализирован большой объем литературы по теме диссертации, начиная с 50-х годов прошлого века и до самого последнего времени. Рассмотрено применение различных методов хранения штаммов грибов, включая субкультивирование, хранение под маслом, под водой, лиофилизация и криоконсервация. Показаны плюсы и минусы каждого метода. Подробно описаны физико-химические процессы, происходящие в гифах при криоконсервации и лиофилизации, а также факторы, влияющие на выживаемость грибов. Литературный материал изложен четко и емко, в хорошей стилистике, что облегчает его восприятие.

Обзор литературы представляет большой интерес и добавляет ценность проделанной диссертантом работы, особенно для экспериментальных микологов и специалистов, работающих с чистыми культурами грибов.

К обзору литературы нет вопросов и замечаний. Хотелось бы только отметить стилистическую манеру автора, в некоторых случаях, неуместную. Так, например, на стр. 26. в разделе 1.3.3 написано «На сегодняшний день, широко распространено использование метода “агаровых блоков” ...» и в конце предложения стоит ссылка (Hwang, 1960; Hwang, 1966; Hwang, 1968), которая никак не вяжется с «сегодняшним днем». Такие несоответствия несколько раз встречаются в тексте.

В главе «**Материалы и методы**» представлены сведения о проведенной работе по сбору и выделению грибов в чистую культуру, использованных методах молекулярной идентификации, формированию базовой и рабочей коллекций культур макромицетов, представлены соответствующие таблицы со списками выделенных культур в приложении и тексте главы. Дан список видов, вошедших в рабочую коллекцию, с характеристикой их полезных свойств. Подробно представлены все используемые в работе методы хранения штаммов и разработанные автором модификации, методы проведенных культурально-морфологических, физиологических и биохимических исследований, а также методы статистической обработки данных.

Из основных замечаний хотелось бы отметить следующие:

1. В главе «Материалы и методы» почему-то представлены не только места и методы сбора образцов макромицетов и получения чистых культур, но и приведены полученные результаты формирования базовой коллекции культур с географическим, таксономическим и эколого-трофическим анализом и результирующими диаграммами. Представлены также полученные данные по формированию рабочей коллекции с таксономическим анализом. Эти данные было бы целесообразно поместить в главу «Результаты и обсуждение», поскольку они таковыми и являются.

2. В таблице 1 и Приложении 2 (таблица 19) представлены штаммы, соответственно, рабочей и базовой коллекций. По-видимому, они взаимодополняемые (хотя пользоваться такими таблицами крайне неудобно), т.к. в таблице 19 представлены данные о происхождении штаммов, но нет субстрата, на котором рос гриб, а в таблице 1 представлен субстрат, но нет происхождения. Однако в обеих таблицах отсутствуют данные о дате сбора образцов и дате помещения их в коллекцию.

3. Из 74 штаммов базовой коллекции, сформированной автором, молекулярными методами было верифицировано только 8, из 20 штаммов, отобранных в рабочую коллекцию. Почему не все, даже рабочие, штаммы были верифицированы? Почему для верифицированных штаммов не указаны идентификационные номера Генбанка, если, как сказано на стр. 32, «полученные последовательности были депонированы в GenBank»?

4. В начале раздела 2.2. «Методы хранения штаммов» перечислены три использованных в работе метода: субкультивирование, под водой и криохранение. Почему в список не включен метод лиофилизации, которому в работе уделяется довольно большое внимание?

5. В разделе 2.4 «Физиологические характеристики» на стр. 45 сказано: «После изъятия с хранения и последующего посева на чашки Петри со средой № 337, культуры инкубировали при +25 °С в течение 21 суток. В процессе инкубации, измеряли диаметры колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях каждые 24 часа (Burnett, 1976). На 10 сутки проводили итоговый замер и сравнение значений диаметра колоний с контрольными значениями. В качестве контроля использовали данные о диаметре колоний исследуемых штаммов, полученные для первых пассажей после изоляции на 14 сутки инкубации при + 25 °С». Непонятно, почему в опыте итоговый замер был на 10 сутки и его сравнивали с контролем на 14 сутки? И для чего культуры выращивали 21 сутки?

В главе «**Результаты и обсуждение**» представлены данные сравнительного изучения используемых методов хранения. Оценивали

жизнеспособность чистых культур, морфолого-культуральные, физиологические и биохимические (активность эндогликолиз) характеристики штаммов. Были выявлены методы хранения, наиболее подходящие для исследованных штаммов. При этом такие методы хранения, как субкультивирование и под дистиллированной водой показали 100% выживаемость исследованных штаммов. Метод криоконсервации показал неоднозначные результаты – выживаемость ряда штаммов зависела от использованного протокола и криопротектора. Лучшие результаты по выживаемости и физиолого-биохимическим характеристикам штаммов рабочей коллекции были показаны при использовании «зернового протокола». Важные данные были получены при разработке методов сублимации. Безусловно, срок 8 месяцев, в течение которого хранились штаммы, явно недостаточен для окончательных выводов о возможности хранить штаммы макромицетов методом лиофилизации, но позитивный результат, полученный автором для ряда штаммов, дает основание с оптимизмом относиться к возможности использования этого метода для долгосрочного хранения макромицетов.

По данной главе хотелось бы высказать следующие замечания:

1. Во введении на стр. 10 в разделе «Научная новизна» написано: «Впервые получены данные о морфолого-культуральных и физиологических характеристиках вида *Sarcosoma globosum*». Но в работе данные о морфолого-культуральных особенностях исследуемого штамма *S. globosum* почему-то не приведены.

2. В разделе 3.2. «Морфолого-культуральные характеристики штаммов» фактически не представлены данные, характеризующие макро- и физиологические признаки колоний, как это требуется по методу Сталперса (Stalpers, 1978) и Бухало (1988), на котором основывается автор. В таблице 3 представлены только 5 типов молодых колоний с неподписанными иллюстрациями сомнительного качества. Отсутствуют сравнительные морфологические характеристики колоний до и после хранения как

макроморфологических признаков (тип колонии, краевая зона, внешняя линия, цвет, запах, реверзум), так и микропризнаков (тип гиф, их диаметр, частота и характер ветвления, наличие и тип пряжек, частота, другие особенности гифальной системы, структуры бесполого спороношения, артро- и бластоконидии, хламидоспоры, орнаментация гиф, кристаллы и другие особенности), как это требуется по заявленному методу Сталперса. В работе же данные представлены неполно и хаотично. Самым целесообразным при таком большом объеме обрабатываемого материала представляется сводная таблица по всем исследованным штаммам с описанием всех перечисленных признаков в сравнении до и после хранения и не на 10, а после 14 дня роста, когда гифы дифференцируются и, обычно, уже сформированы все признаки. Молодые же колонии все белые и пушистые, там трудно найти отличия.

3. Есть замечания к оформлению таблиц. В работе нет специального раздела по аббревиатуре и сокращениям, поэтому, расшифровку сокращений следует давать не только в тексте при первом упоминании, но в примечаниях к таблицам. В таблица 2 в шапке сплошная аббревиатура и сокращения (СП, ДВ, СУБ, АБ, ПП, ЗП, Г, Т, ГТ, н/д), а в Примечании расшифровано только, что такое Г, Т и, почему-то, Г+Т (в шапке таблицы стоит ГТ). Об остальных обозначениях остается только догадываться. В таблице 4 данные о штамме MR55 *Flammulina rossica*, где указано, что после сублимации у культуры 1 пряжка на 500 мкм, отличаются от данных в табл. 2, где сублимация этого штамма, видимо, не проводилась – стоит н/д (нет данных?). Для штамма *Pleurotus ostreatus* MR1 после сублимации указано 2 пряжки, тогда как в тексте раздела 3.2.2 говорится о полной утрате пряжек. Названия таблиц 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17 звучит одинаково «Средние значения диаметров колоний штаммов после периода хранения (на 10 сутки)». Такая же ситуация с таблицами 6, 8, 10, 12, 14 и 16. Все они также названы одинаково «Средние значения ростового коэффициента (РК) исследуемых штаммов после периода хранения». Конечно же, следовало уточнить все названия, добавив метод хранения, чтобы не было повторов.

4. Особо хотелось бы обратить внимание на низкое качество фотографий плодовых тел грибов и исследуемых колоний. Этим иллюстрациям, как при съемке, так и при их оформлении не было уделено должного внимания. Фото плодовых тел были сделаны без штатива, не в нужном ракурсе, не показан гименофор, нет масштабной линейки. Фото колоний представлены в закрытых чашках с ненужными надписями, с бликами, не на принятом в микологии сером фоне, без масштаба. Инокуляция колоний не была унифицирована в определенную зону чашки Петри (в центр или сбоку), поэтому колонии на фото выглядят вразнобой, неопрятно.

5. Хотелось бы предостеречь диссертанта от поспешных оценок способности тех или иных видов макромицетов переносить условия хранения с использованием определенных протоколов. В проведенное исследование было включено лишь по одному штамму каждого вида, но от штаммового разнообразия, как говорится, ни один вид не застрахован, поэтому делать выводы можно лишь относительно конкретных исследованных штаммов, не экстраполируя их на вид в целом.

В **Списке литературы** представлен большой объем использованной литературы, в основном иностранной. Однако оформление списка литературы не соответствует ГОСТ Р 7.0.100-2018, который должен использоваться для библиографических описаний. Ошибки в оформлении, которые сразу бросаются в глаза: перед сборниками и журналами, включая иностранные, везде должно быть // , а не точка или «In:». Между областями должна быть точка и тире, а не только точка (только точка используется в ссылках, а это список). Москва и пр. в месте издания не сокращается, перед двоеточием (которое перед издательством) ставится пробел. Издательство не дается в кавычках. Сведения, относящиеся к заглавию (учебное пособие, диссертация и пр.) должны идти после двоеточия с пробелом перед и с маленькой буквы, а не после точки и с заглавной.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Н.С. Комиссаров за короткий срок проделал

огромный объем экспериментальной и аналитической работы и получил ценные результаты, которые послужат основой как для применения их при хранении штаммов макромицетов в коллекциях, так и для будущих исследований в этом направлении. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.18. Микология, а именно следующим ее направлениям: биологическое разнообразие грибов; культивирование грибов; сохранение чистых культур грибов; физиология, метаболизм и биохимия грибов; (по Биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Комиссаров Никита Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.18 Микология.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,
ВЕДУЩИЙ НАУЧНЫЙ СОТРУДНИК С ВОЗЛОЖЕНИЕМ
ОБЯЗАННОСТЕЙ РУКОВОДИТЕЛЯ лаборатории биохимии грибов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук
(БИН РАН)

ПСУРЦЕВА Надежда Васильевна

подпись

20.02.2025, Дата подписания

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.18 – Микология

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

197022, (Россия) г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический
институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук, лаборатория
биохимии грибов

Тел.: ; e-mail: