

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу Фокіної Анастасії Володимирівни «Біотехнологія мікроклонального розмноження *Origanum vulgare* L. та *Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P. fortunei* (Seem.) Hemsl.», представлену на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія

Актуальність темн. Дисертаційна робота Фокіної Анастасії Володимирівни присвячена розробленню технологій мікроклонального розмноження в культурі *in vitro* нових малопоширених культур рослин – материнки звичайної (*Origanum vulgare* L.) та міжвидового гібрида павловнії *Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P. fortunei* (Seem.) Hemsl.

Материнка звичайна (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*) є цінною трав'янистою ефіроолійною культурою, яка використовується у фармацевтичній та харчовій галузях виробництва як джерело натуральних корисних речовин. Для розвитку селекції материнки звичайної із високим вмістом ефірної олії високої якості та швидкого розмноження високопродуктивних зразків актуальною є розробка всіх стадій і етапів технології мікроклонального розмноження *in vitro*.

Павловнія (*Paulownia* sp., *Paulowniaceae*) – цінна біоенергетична та декоративна деревна культура, яка відрізняється високою швидкістю росту. Лише протягом першого року дерева можуть досягати 4-6 м, впродовж другого року виростати ще на 2-3 м. Павловнія походить з південної і південно-східної Азії і в дикій флорі України не зустрічається. Проте, ґрунтово-кліматичні умови України з потеплінням клімату стають придатними для вирощування цієї цінної біоенергетичної культури, а розширення площ під павловнію потребує значної кількості стандартизованого садивного матеріалу. Наявні публікації із мікроклонального розмноження павловнії розглядають реакцію на окремі фактори культивування різних видів цього роду. Втім залишаються нез'ясованими реакція цієї культури на умови *in vitro* та дорощування мікроклонованого садивного матеріалу в ґрунті.

Отже, розроблення методики мікроклонального розмноження *in vitro* українських селекційних зразків материнки та отримання садивного матеріалу конкретного виду павловнії в умовах України, безперечно, є актуальною темою дисертаційної роботи.

Вирішення даного завдання дисертантка пропонує шляхом розроблення комплексної біотехнології та складання апаратурно-технологічної схеми мікроклонального розмноження нових малопоширених культур материнки звичайної та гібрида павловнії *P. elongata* × *P. fortunei*. Такий підхід є більш сприятливим для навколишнього середовища і дозволяє за короткий період провести мультиплікацію материнського генотипу рослин з отриманням численних генетично ідентичних копій.

Запропонований підхід базується на активації пазушних бруньок та багаторазовому стерильному живцюванні. Стадія мікроклонального розмноження рослин в ізолюваній асептичній культурі *in vitro* включає такі основні етапи як стерилізація та введення експлантів в культуру *in vitro*, багаторазове стерильне живцювання та укорінення рослин-регенерантів *in vitro* перед перенесенням в ґрунт. Стадія мікроклонального розмноження рослин в ґрунті в умовах *ex vitro* включає етапи перенесення рослин-регенерантів у ґрунт, їхнє вирощування у ґрунті за принципом масштабування, пересадку рослин-регенерантів на постійне місце зростання, про що свідчать також результати попередніх досліджень, процитовані у даній роботі.

Дисертаційна робота виконана у рамках НДР кафедри біотехнології ДВНЗ Український державний хіміко-технологічний університет «Дослідження механізмів керування біотехнологічними процесами на основі біооб'єктів різних таксономічних груп», 2016-2019, номер державної реєстрації 0116U000962.

Достовірність і обґрунтованість результатів і наукових положень. Результати експериментальної роботи, отримані дисертанткою, є достовірними та взаємодоповнюючими, а висновки – обґрунтованими та послідовними, що логічно пов'язані із метою та завданням роботи. Для виконання завдань даної роботи було обрано оптимальні методики, обґрунтовані аналізом літературних джерел. Зокрема, метод культури клітин, тканин та органів *in vitro*, метод мікроклонального розмноження рослин шляхом активації пазушних бруньок і стерильного живцювання, метод масштабування за вирощування садивного матеріалу *ex vitro*, порівняльний термогравіметричний аналіз для визначення термостабільності деревини, методи статистичного аналізу експериментальних даних. Результати, отримані дисертанткою, статистично достовірні та докладно обговорені у 3, 4 та 5 розділах дисертації.

Наукова новизна результатів дослідження. У представленій роботі отримано результати, які мають наукову новизну. Зокрема, дисертанткою було вперше:

- показано роль генотипового фактора та ефекту взаємодії «генотип×середовище» у реалізації здатності материнки до мікроклонального розмноження.

- досліджено здатність до мікроклонального розмноження шляхом активації пазушних бруньок та стерильного живцювання одинадцяти генотипів материнки звичайної, які використовуються як вихідний селекційний матеріал для створення вітчизняних сортів цієї культури.

- досліджено потенціал до мікроклонального розмноження різних генотипів материнки із використанням експлантів різних типів – міжвузлів різної локалізації, пазушних і верхівкових бруньок.

– встановлено характер залежності росту і розвитку живців павловнії в умовах *in vitro* від концентрації 6-бензиламінопурина (БАП) на ауксиновому і безауксиновому фоні.

– вивчено вплив біочару та активованого вугілля на стан живців та ризогенез павловнії.

– складено комплексні біотехнології мікроклонального розмноження материнки і павловнії та розроблено апаратурно-технологічні схеми для виробництва методом мікроклонального розмноження садивного матеріалу цих культур.

Дисертаційна робота оформлена відповідно до вимог МОН України і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, їх узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який містить 222 посилання, додатків. Дисертаційна робота викладена на 224 сторінках друкованого тексту та містить 34 рисунки, 54 таблиці. Авторкою опрацьовано великий об'єм літературних джерел, опублікованих протягом останніх 5-10 років, більшість з яких (181) є англomовними, що дозволило у повному обсязі розкрити сучасний стан наукових розробок у галузі біотехнології мікроклонального розмноження та отримання садивного матеріалу конкретного виду. Мова дисертації – логічна, зрозуміла та легка для сприйняття.

Практичне значення даної роботи полягає у тому, що розроблено та рекомендовано до використання в технологіях мікроклонального розмноження материнки звичайної та павловнії умови стерилізації донорного матеріалу, склад живильних середовищ для індукції пагоноутворення при введенні в культуру *in vitro*, стерильного живцювання на ранніх і пізніх циклах, ризогенезу *in vitro*, а також умови адаптації та вирощування рослин-регенерантів в ґрунті та отримання садивного матеріалу. Складено блок-схеми технологій мікроклонального розмноження материнки та павловнії, а також апаратурно-технологічні схеми для забезпечення технологічного процесу виробництва мікроклованого садивного матеріалу.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях. Матеріали роботи пройшли апробацію на 5 міжнародних і всеукраїнських наукових конференціях. Отримані результати та висновки повністю висвітлені в наукових працях, серед яких 2 статті у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, стаття у періодичних наукових виданнях інших держав, які входять до Європейського Союзу, стаття у періодичних наукових виданнях, включених до наукометричної бази Scopus та 5 тез у матеріалах наукових конференцій, методичні рекомендації.

Характеристика структури дисертації.

У вступі обґрунтовано актуальність теми роботи, сформульовано мету та завдання, визначено предмет та об'єкт дослідження, охарактеризовано

новизну та практичне значення роботи, наведено перелік вітчизняних та міжнародних наукових конференцій, на яких апробовано результати роботи.

У першому розділі «Огляд літератури» повно та широко охарактеризовано основні принципи мікроклонального розмноження рослин. Авторкою окреслено сучасний стан ринку садивного матеріалу культивованих рослин, отриманих із обов'язковим залученням мікроклонального розмноження в культурі *in vitro*, наведено найбільш розповсюджені види технологій мікроклонального розмноження для видів рослин, які забезпечують швидку мультиплікацію одного вихідного експланту. Також, детально охарактеризовано особливості технологічних стадій і етапів мікроклонального розмноження. Далі дисертанткою охарактеризовано господарське значення, біологічні особливості та культури *in vitro* материнки звичайної. Культура материнки звичайної в нашій країні представлена лише двома зареєстрованими сортами, що потребує інтенсифікації селекційної роботи зі створення нових вітчизняних сортів із подальшим швидким розмноженням і отриманням великої кількості здорового, генетично однорідного садивного матеріалу. Також наведено господарське значення, біологічна характеристика та культура *in vitro* павловнії. На основі даного аналізу сформульовано висновок щодо новизни даної роботи у порівнянні із попередніми дослідженнями.

У другому розділі «Матеріали і методи» охарактеризовано генотипи Д1, Д2, Д3, Д4, Д5, Д7, Д8, Д9, Д10, Д11 та Д13 материнки звичайної *Origanum vulgare* L., отримані від Дослідної станції лікарських рослин Інституту агроєкології та природокористування НААН та міжвидовий гібрид видів *P. elongata* S.Y.Hu і *P. fortunei* (Seem.) Hemsl. павловнії, безпосередньо в дослідженні використано рослини, які є нащадками клону Paulownia Clone in Vitro 112 цього міжвидового гібрида. Рослини Paulownia Clone in Vitro 112 були закуплені бі дисертанткою у фірми ТОВ «Павловнія Енерджи Україна». Також, охарактеризовано оптимізацію на технологічній стадії мікроклонального розмноження *O. vulgare* та *P. elongata* × *P. fortunei* в ізольованій асептичній культурі в умовах *in vitro* (стадія I), в ґрунті в умовах *ex vitro* (стадія II). Описано методики ізольованої культури клітин, тканин та органів *in vitro*. Методики, що було застосовано в даній роботі, ґрунтуються на результатах аналізу літературних джерел. Ці методики було адаптовано дисертанткою до умов досліджень, вміло та доречно застосовані для реалізації мети та завдань дисертаційної роботи.

У третьому розділі «Розробка біотехнології мікроклонального розмноження *O. vulgare*» описано послідовні етапи мікроклонального розмноження *O. vulgare*, в результаті якого показано, що всі досліджені генотипи *O. vulgare* здатні до мікроклонального розмноження шляхом активації пазушних бруньок в культурі *in vitro*, проте характер реакції материнки на варіювання факторів культивування *in vitro* та вирощування *ex vitro* є генотипоспецифічним. Було визначено оптимальним серед досліджених для більшості досліджених генотипів материнки звичайної в I

циклі стерильного живцювання є середовище MS+30 г/л глюкози, а в III циклі – MS+30 г/л глюкози + 0,05 мг/л ІОК + 1,0 мг/л БАП. Також, було рекомендовано для отримання довшої кореневої системи живців на пізніх етапах мікроклонального розмноження використовувати середовища для ризогенезу із урахуванням специфічної реакції генотипів материнки звичайної: для генотипів Д1-Д3, Д8, Д9 – $\frac{1}{2}$ MS+2 мг/л ІОК, 20 г/л сахарози, для Д4, Д7, Д10 – $\frac{1}{2}$ MS без фітогормонів, 20 г/л сахарози або 20 г/л глюкози, для Д5 – $\frac{1}{2}$ MS без фітогормонів, 20 г/л сахарози або $\frac{1}{2}$ MS+2 мг/л ІОК, 20 г/л глюкози, для Д11 – $\frac{1}{2}$ MS без фітогормонів, 20 г/л сахарози, для Д13 – $\frac{1}{2}$ MS+1 мг/л ІМК, 20 г/л сахарози.

У четвертому розділі «Розробка біотехнології мікроклонального розмноження *P. elongata* × *P. fortunei*» спочатку наведено результати дослідження оптимізації на етапі введення павловнії в культуру *in vitro*. Оскільки для подальшого мікроклонального розмноження основними технологічними операціями, які відпрацьовувалися та підпадали під оптимізацію, були стерилізація експлантів та індукція пагоноутворення з експлантів на живильному середовищі *in vitro*. Такими умовами були три послідовних етапи: 1) обробка живців 70%-розчином етилового спирту впродовж 1 хв.; 2) обробка живців 20%-розчином препарату Доместос за дослідних експозицій; 3) обробка живців 0,1%-розчином сулеми за дослідних експозицій. Далі, як і для материнки, у розділі наведено результати впливу фітогормонів та інших компонентів живильних середовищ на ріст і розвиток пазушних бруньок *in vitro*, ефективності укорінення рослин-регенерантів в останньому циклі живцювання, екологічної та біоенергетичної цінності рослин павловнії. Проведена оптимізація дозволила збільшити максимальний коефіцієнт розмноження на етапі введення павловнії в культуру *in vitro* від $2,2 \pm 0,2$ живця/експлант до $3,7 \pm 0,4$ живця/експлант, у II циклі стерильного живцювання до $6,9 \pm 0,4$ живця/експлант, а у VI циклі – до рівня $6,8 \pm 0,2$ живця/експлант. Досягнуті за рахунок оптимізації максимальні значення показників надалі складають для частоти коренеутворення на етапі ризогенезу *in vitro* – 100%, для виживаності під час перенесення з умов *in vitro* в ґрунт планшетів *ex vitro* – $92,9 \pm 4,2\%$, з планшетів у горщики – $94,3 \pm 5,6\%$, під час перезимівлі в горщиках – 100%, з горщиків – в польові умови на постійне місце вирощування – 100%.

У п'ятому розділі «Узагальнення досліджень з оптимізації біотехнологій мікроклонального розмноження материнки і павловнії» наведено принципові технологічні схеми виробництва садивного матеріалу *O. vulgare* та *P. elongata* × *P. fortunei* методом мікроклонального розмноження. В результаті проведеної оптимізації запропоновано біотехнологію отримання садивного матеріалу *O. vulgare* шляхом мікроклонального розмноження з коефіцієнтом розмноження 387 одиниць садивного матеріалу на I вихідний материнський живець. В результаті проведеної оптимізації запропоновано біотехнологію отримання садивного матеріалу *P. elongata* × *P. fortunei* шляхом мікроклонального розмноження з

коефіцієнтом розмноження 99 одиниць садивного матеріалу на 1 вихідний материнський живець.

Висновки із дисертаційної роботи відповідають меті та поставленим завданням і повністю обґрунтовані експериментальними даними.

Однак, не зважаючи на загальне позитивне враження від дисертації, виникли наступні зауваження та дискусійні питання:

1. У таблиці 3.2 не розкрито, чому саме для цього дослідження обрали генотипи Д1, Д7 і Д8. Також показано дуже великий довірчий інтервал.

2. У таблицях 3.10, 3.11, 3.12 наведені усереднені дані за генотипами, які практично не відрізняються від контрольних або є гіршими. Слід було наводити дані за окремими генотипами.

3. У висновках до розділу III не наведено, які саме досліджені генотипи материнки краще реагують на зміну складу живильного середовища та умов культивування.

4. У «Матеріалах дослідження» не пояснено, що таке зразки Д1, Д2 та ін.

Зазначені зауваження не знижують загальної наукової цінності роботи.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Фокіної А.В. «Біотехнологія мікроклонального розмноження *Origanum vulgare* L. та *Paulownia elongata* S.Y.Hu × *P.fortunei* (Seem.) Hemsl.» відповідає вимогам МОН України до кваліфікаційних наукових праць, а саме Наказу МОН України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам, передбаченим пунктом 10 Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії, затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 6 березня 2019 року № 167, а її авторка заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія (галузь 16 Хімічна та біоінженерія).

Офіційний опонент:

Декан факультету захисту рослин,

біотехнологій та екології

Національного університету біоресурсів

і природокористування України,

доктор сільськогосподарських наук, професор

Ю. В. Коломієць

Відгук надійшов до
спеуради ДР 08 078.007 24.05.2021

Голова разової спеуради

ДР 08 078.007

Гриш

(Штещенко І.І.)

