ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Загричук Оксани Михайлівни** «Отримання культури *in vitro Deschampsia antarctica* Desv. та її фізіолого-генетичне вивчення», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Актуальність теми дисертаційної роботи. Щучник антарктичний (*Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)) – один з двох видів судинних рослин, що ростуть на західному узбережжі Антарктичного півострова та прилеглих до нього островах. Генетична й біохімічна обумовленість таких ознак, як морозостійкість, стійкість до світлового стресу, високий рівень фотосинтезу за низьких температур та можливість існування в умовах підвищеної ультрафіолетової радіації робить цей вид надзвичайно цікавим об'єктом для дослідження, особливо зважаючи на його здатність не лише вегетувати, а й вільно розмножуватись у цих суворих умовах Антарктики. Вид *D. antarctica* цікавий і тим, що є природним джерелом антиоксидантів, що можуть використовуватися у фармацевтичній та харчовій промисловості та косметології. Встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми.

Зважаючи на складність збору достатньої кількості рослинного матеріалу в природних умовах доцільним є введення цієї рослини в культуру *in vitro*. Це надасть можливість у контрольованих лабораторних умовах моделювати дію різних абіотичних стресових факторів і визначати їх вплив на фізіологічні, біохімічні та генетичні параметри. Зважаючи на унікальні властивості цього виду, вивчення його механізмів стійкості до комплексу екстремальних факторів можна розглядати як основу для розуміння процесів пристосування живих організмів до абіотичних стресів.

Разом з тим, використання біотехнологічних підходів для розмноження цієї рослини в культурі *in vitro* обмежується відсутністю добре відтворюваних методик, а також недостатньою вивченістю морфогенетичного потенціалу

тканин та органів даного виду. У зв'язку з цим, дисертаційна робота Загричук О.М., присвячена отриманню та вивченню культури тканин, органів і мікроклонально розмножених рослин *D. antarctica* та створенню в умовах *in vitro* експериментальної модельної системи для фізіологічних та генетичних досліджень є безумовно актуальною і практично значимою. Такі експериментальні роботи надають важливий фактичний матеріал як для поглиблення наших знань про процеси морфогенезу *in vitro*, подальшого розвитку та вдосконалення методів розмноження *in vitro*, як одного із фундаментальних напрямів біотехнології рослин, так і для розробки практичних аспектів застосування біотехнологічних підходів для створення нових сорти цінних господарських культур, здатних витримувати дію несприятливих умов навколишнього середовища.

В дисертаційній роботі чітко визначені ідея досліджень, робоча гіпотеза та логіка постановки експериментів. Вона має класичну структуру та складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох експериментальних розділів, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літератури, що включає 291 найменування. Дисертація містить 7 таблиць і 27 рисунків.

У розділі 1 «Огляд літератури» узагальнено інформацію про біологічні та екологічні особливості *D. antarctica*. Розглянуто ареал та фактори поширення виду. Описано основні адаптаційні механізми пристосування рослин до існування в екстремальних умовах: фізіолого-біохімічні, цито- та молекулярно-генетичні. Особливу увагу приділено актуальності введення в культуру *in vitro D. antarctica* як модельного об'єкта для дослідження впливу стресових факторів. Викладений в літературному огляді матеріал свідчить про володіння дисертантом інформацією про сучасний стан проблеми, що дозволило їй вибрати адекватні методичні підходи для вирішення основної мети та завдань, які поставлені в роботі.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» детально описані умови проведення експериментів: рослинний матеріал; умови культивування in vitro; отримання асептичних проростків та умови вегетативного розмноження; отримання калюсних культур та підбір умов для їхньої проліферації; методики дослідження впливу йонів кадмію на рослини *D. antarctica* in vitro; методи цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу; статистичні методи обробки результатів досліджень.

У розділі 3 «Культивування D. antarctica in vitro» представлено результати власних експериментальних досліджень автора з індукування морфогенезу та мікроклонального розмноження даного виду. У результаті проведених досліджень вивчено сезонну періодичність проростання насіння, його схожість та залежність цих процесів від різних чинників. Для рослин усіх популяцій встановлено спільні ознаки: доцільність використання як стерилента пероксиду гідрогену; порушення спокою насіння стратифікацією та обробкою гібереловою кислотою; проростання насіння на світлі.

З'ясовано, що оптимальним для мікроклонування було середовище B5, доповнене 0,1–0,2 мг/л кінетину або 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти. Підібрано умови для індукції, проліферації калюсу та отримано тривало вирощувану культуру тканин із експлантів рослин шести локалітетів. Встановлено, що найбільшою підтримуючою здатністю для калюсогенезу з кореневих та пагонових експлантів характеризувалося середовище B5, доповнене 0,9–1 мг/л 2,4-Д і 0,09–0,1 мг/л БАП.

При проведенні досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення, виявлено спонтанну регенерація пагонів. Показано, що органогенез відбувався не лише одразу після індукції калюсної тканини, але й при тривалому її культивуванні. Встановлено залежність частоти органогенезу від мінерального складу живильного середовища та концентрацій регуляторів росту у ньому, а також місця зростання рослин-донорів калюсних інокулюмів. Показники регенерації були найвищими

при культивуванні калюсу на середовищі B5, доповненому 0,9 мг/л 2,4-Д та 0,09 мг/л БАП. Одержані пагони вкорінено та підібрано умови для росту рослин-регенерантів. Виявлено на порядок більший приріст біомаси регенерованих з калюсу рослин *D. antarctica*, порівняно з рослинами, отриманими шляхом пророщування насіння в умовах *in vitro*.

У розділі 4 «Генетичне дослідження отриманих мікроклональним розмноженням рослин D. antarctica» наведено результати вивчення генетичної мінливості мікроклонально розмножених рослин цього виду із використанням молекулярно-генетичного та цитогенетичного аналізу. Аналіз вихідних рослин *D. antarctica*, отриманих із насіння виявив 106 ампліконів, 39 (35 %) з яких були поліморфними. Значення попарних генетичних відстаней Жакарда між різними генотипами знаходилися в межах 0,145–0,277. Цитогенетичний аналіз використаних у роботі рослин показав, що обидва зразки з о. Галіндез (генотипи G/D12-2a та G/D 20) мають типовий для цієї рослини диплоїдний набір хромосом 2n = 26. Водночас, в однієї із рослин з о. Дарбо (генотип DAR12) у кореневій меристемі, поряд із клітинами з типовим набором хромосом, знайдено клітини, які мали додаткові B-хромосоми. Порівняльний аналіз рослин на початкових етапах розмноження (1–6-й пасажі) та за тривалого культивування *in vitro* (24–26-й пасаж та більше) не виявив генетичних відмінностей між клонами спільного походження та вихідним генотипом за ISSR-маркерами. Аналіз тривало культивованих рослин (49–79-й пасажі) також показав збереження цитогенетичних характеристик рослин.

У розділі 5 «Дослідження впливу йонів кадмію на рослини *D. antarctica*» представлено результати досліджень впливу різних концентрацій йонів кадмію на ріст і розвиток культивованих *in vitro* рослин *D. antarctica* та його накопичення у рослинах цього виду. У результаті дослідження виявлено, що концентрації кадмію 1,5–20 мМ призводять до зупинки росту та наступної загибелі рослин. За присутності у живильному

середовищі 5–20 мМ Cd^{2+} рослини гинули через 3 тижні, 1,5–5 мМ Cd^{2+} – через 4–6 тижнів культивування. Встановлено, що *D. antarctica* зберігає здатність виживати за умови, коли концентрація Cd^{2+} у живильному середовищі не перевищує 1 мМ.

Вивчено накопичення йонів кадмію в рослинах *D. antarctica* з островів Галіндез (G/D12-2a) та Великий Ялур (Y66), культивованих *in vitro* в присутності різних концентрацій токсиканта (0,2 мМ, 0,5 мМ та 1 мМ) упродовж 7, 14, 21, 28 та 35 діб. Суттєвих відмінностей щодо його акумулювання рослинами з цих локалітетів не виявлено. Основна кількість Cd^{2+} за різних концентрацій у живильному середовищі накопичується рослинами впродовж перших семи діб культивування.

Для аналізу мутагенного впливу йонів кадмію на *D. antarctica* було вивчено вплив токсиканта на рівень генетичних перебудов за різної тривалості культивування рослин. У *першому варіанті досліду*, *D. antarctica* вирощували за широкого спектру концентрацій Cd^{2+} (0,1–10 мМ) упродовж 63 діб. Встановлено, що у рослин, культивованих при 0,1 або 0,2 мМ Cd^{2+}, у порівнянні з контрольними, змін у спектрах ПЛР-продуктів не відбувалося. При концентрації 1 мМ рівень відмінностей від контрольних рослин становив 15,9 %. Водночас, у зразках, які культивували у присутності Cd^{2+} у концентраціях вище 1 мМ, спостерігали зменшення інтенсивності спектру ПЛР-продуктів із втратою фрагментів переважно у зоні 700–2000 п.н.

У *другому варіанті досліду* для вивчення гострої дії важкого металу на генетичний апарат *D. antarctica*, рослини культивували 17 діб у присутності йонів кадмію від 0,2 до 1 мМ. Зміни в спектрах були виявлені лише за вмісту Cd^{2+} вище 0,4 мМ, які проявлялися у вигляді зміни копійності та у появі нових фрагментів. Значення генетичних дистанцій між рослинами зростали із збільшенням концентрації йонів кадмію в живильному середовищі від 3,5 до 11,4 %.

Третій варіант досліду був спрямований на вивчення хронічної дії йонів кадмію на геном *D. antarctica*. Дослід передбачав тривале культивування рослин (96–265 діб) за порівняно невисоких концентрацій (0,1 мМ та 0,4 мМ) кадмію. Встановлено, що у рослин, які після культивування на середовищі з кадмієм, упродовж тривалого часу росли у живильному середовищі без важкого металу, не виявлено відмінностей від контрольних рослин. Отже, отримані результати свідчать про стійкість *D. antarctica* до йонів кадмію, порівняно із іншими вищими судинними рослинами.

У розділі 6 «Аналіз і узагальнення результатів дослідження» стисло і чітко узагальнені результати досліджень, які підтверджують обгрунтованість робочої гипотези автора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету (ТНПУ) імені Володимира Гнатюка у співпраці з відділом генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у рамках проекту Національного антарктичного наукового центру, Держкомінформнауки: 2010–2012 N H12/2012 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів» та наукової бюджетної теми ІМБІГ НАНУ «Мінливість геному рослин в екстремальних умовах зростання» (№ держреєстрації 0115U003743, 2016-2020 рр).

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертаційна робота є оригінальним та завершеним дослідженням у якому автором *вперше*: шляхом пророщування асептичного насіння введено в культуру *in vitro* рослини *D. antarctica* із західного узбережжя Антарктичного півострова (о-ви Галіндез, Скуа, Барселот, Дарбо, Великий Ялур, Лехіл та мис Расмуссен). Застосовано комплексний підхід до отримання культури тканин і органів, мікроклонального розмноження рослин цього виду, формування та

вкорінення отриманих рослин; досліджено особливості культивування *in vitro* різних вихідних генотипів. Із використанням ISSR-аналізу та цитогенетичного аналізу показано збереження генетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* та зроблено висновок про можливість і доцільність використання розробленого способу для отримання генетично однорідних рослин *D. antarctica.* В умовах *in vitro* оцінено вплив різних концентрацій йонів кадмію у живильному середовищі на ріст і розвиток рослин *D. antarctica* та вивчено особливості накопичення цього токсиканта у рослинах за його різного вмісту у живильному середовищі та різної тривалості дії на рослини. Встановлено, що *D. antarctica* характеризується стійкістю до йонів кадмію порівняно із іншими видами вищих судинних рослин;

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що автором розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу для біотехнологічних досліджень *D. antarctica*, який дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду. Наявність цих рослин важлива, зважаючи на особливий статус Антарктики та несприятливість кліматичних умов регіону для проведення регулярних досліджень. Встановлено здатність експлантів *D. antarctica* до спонтанної регенерації *in vitro* та розроблено спосіб мікроклонального розмноження рослин цього виду, який надає можливість клонувати рослини з стабільними генетичними характеристиками для подальшого їх використання у дослідженнях, спрямованих на вивчення фізіолого-біохімічних параметрів рослини *D. antarctica* за дії різних стресових чинників.

Теоретичне значення результатів досліджень. Дослідження особливостей мікроклонального розмноження у зв'язку із відтворенням *D. antarctica* поглиблюють та розширюють уявлення: про морфогенез рослин в культурі *in vitro*; екзогенні та ендогенні чинники, які лімітують формування

мікроклонів і пошуки шляхів підвищення частоти індукції регенерації; мінливість та стабільність геному при культивуванні; генетичні та фізіологічні основи детермінованості процесів морфогенезу в умовах *in vitro*.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертант опрацював значний масив даних літератури з адаптаційних механізмів пристосування рослин до існування в екстремальних умовах: фізіолого-біохімічні, цито- та молекулярно-генетичні. Проаналізовано вплив дії важких металів на ріст та розвиток рослин. Понад 80 відсотків використаних літературних джерел – публікації останніх років. Це дало змогу обґрунтувати вибір теми наукової роботи та методичних підходів для реалізації поставлених завдань.

Логічне та конкретне планування досліджень дозволило пошукачу виконати поставлені завдання і одержати великий обсяг експериментального матеріалу, який чітко та послідовно викладений в розділах власних досліджень та аналізу результатів. При виконанні роботи дисертантом застосовано сучасні методи досліджень, а саме: культивування рослинних об'єктів *in vitro*; біометричні, метод атомно-абсорбційної спектроскопії, СТАБ-метод виділення ДНК, ПЛР з різними типами ДНК-праймерів (ISSR, IRAP), електрофорез ДНК в агарозному гелі, методи статистичного аналізу.

Наукові результати дисертації отримано на підставі аналізу великого фактичного матеріалу, з використанням сучасних і адекватних поставленим завданням методів досліджень. Достовірність результатів підтверджується відповідною статистичною обробкою. Тому, вважаю, що наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне й теоретичне значення і відповідають високому науковому рівню роботи.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях і авторефераті. Матеріали дисертації відтворені в публікаціях автора і знайшли належне висвітлення на міжнародних наукових форумах. Зокрема,

за матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, у тому числі 8 статей, з них 7 – у фахових виданнях, перелік яких затверджений ДАК МОН України, 1 – у інших виданнях, та 8 – в збірниках матеріалів і тез вітчизняних та міжнародних конференцій. Автореферат адекватно відображує зміст дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Стосовно оформлення дисертації: матеріал викладено чітко і логічно, науковою мовою, доцільно проілюстровано рисунками. Проте слід зазначити деякі слабкі місця представленої роботи:

1. Текст дисертації містить деякі граматичні та стилістичні помилки: «влив» замість вплив (с.14); «подушковидна» замість подушкоподібна (с.26); «мікрогаметофітогенез» замість мікрогаметогенез (с.28); «панонів» замість пагонів (с.35); «аналіз апікальної меристеми» замість аналіз клітин апікальної меристеми (с.47); «алелей» замість алелів (с.66); «клональне мікророзмноження» замість мікроклонального розмноження (с.75); «непрямі регенеранти» (с. 93) і т.і.
2. Автор часто пише «відсоток калюсогенезу» , наприклад с.59,82, 84 хоча калюсогенез це процес, а автор досліджував частоту утворення калюсу.
3. Пошукач часто використовує термін «інтенсивність калюсоутворення». Слід зазначити, що "інтенсивність" - це якісна характеристика, що виражає ступінь сили, напруженості, насиченості якогось процесу, а правильно використовувати термін "частота", який є показником кількісних змін. Тому краще застосовувати термін «частота калюсоутворення».
4. Дисертант зазначає, що «у живильне середовище вносили йони кадмію у певних концентраціях». Мабуть автор мав на увазі певну сіль кадмію, бо не зрозуміло яким чином можливо внести окремі йони цього важкого металу? Крім того, не вказано яку саме сіль кадмію

використовували у дослідженнях. Не зрозуміло, чому автор назву важкого металу пише то з малої, то з великої букви.

5. Виникає питання чи однакова програма ампліфікації для ISSR та IRAP праймерів?
6. Підпис до рис. 5.5 та 5.6 «Зміни едектрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів…» не зовсім коректний, оскільки на рисунках представлено електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК з певними праймерами.

Проте вказані зауваження не носять принципового характеру і не знижують наукової цінності дисертації.

Рекомендації щодо використання результатів дисертаційного дослідження в практиці. Одержані результати мають важливе значення як для фундаментальних, так і прикладних напрямів біотехнології. Результати роботи Загричук О.М. можуть бути використані і впроваджені в наукових дослідженнях та прикладних розробках інститутів, що займаються біотехнологіями рослин, проблемами збереження та відтворення генофонду цінних культур, а також в курсах лекцій з клітинної біології, генетики та фізіології рослин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Дніпропетровського, Запорізького, Львівського, Ужгородського, Харківського, Чернівецького національних університетів. Отримані дані використовуються в курсі «Біотехнологія та генна інженерія», «Загальна екологія» та «Молекулярна генетика» для студентів хіміко-біологічного факультету ТНПУ ім. В. Гнатюка;

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Вважаю, що за обсягом, рівнем, актуальністю та науковим значенням виконаних досліджень, рецензована дисертаційна робота «Отримання культури *in vitro Deschampsia antarctica* Desv. та її фізіолого-генетичне вивчення», є завершеною науковою роботою, яка виконана на сучасному науково-методичному рівні, є новим етапом розвитку біотехнологій цінних культур, та цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження

наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Загричук Оксана Михайлівна заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,
ст. н. сп. відділу генетичної
інженерії ІФРГ НАН України,
доктор біол. наук О.В.Дубровна

Підпис тов. О.В.Дубровної
ПОСВІДЧУЮ
Учений секретар інституту фізіології рослин і генетики НАН України
Підпис
27 жовтня 2017 р.

Академія наук України м.Київ Інститут фізіології рослин і генетики Ідентифікаційний код 05417242