

ВІДГУК

офіційного опонента Голубенко Анастасії Володимирівни на дисертаційну роботу **Пушкарьової Надії Олександрівни «Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*»,** представлену до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Актуальність теми. Традиційні консервативні способи збереження фіторізноманіття дедалі частіше поступаються сучасним біотехнологічним методам, які здатні якщо не замінити, то стати суттєвим доповненням для підвищення ефективності захисту рослинного різноманіття. Біотехнології рослин *in vitro* також дають можливість, без залучення природних генетичних ресурсів, використовувати весь потенціал лікарських, кормових, харчових рослин для отримання цінних вторинних метаболітів або використання їх як селекційного матеріалу для створення нових продуктивних, стійких до хвороб і шкідників, сортів рослин. Особливо важливою є мінімізація втручання у популяції рідкісних і зникаючих рослин, у яких ускладнені можливості спонтанного відтворення у природних місцях зростання через слабку конкурентну здатність, низьку схожість насіння, повільний онтогенез та висока чутливість ювенільних рослин до змін умов навколишнього середовища тощо. Це стосується і об'єкта дослідження – видів роду *Crambe* (Катран), багато з яких є рідкісними, занесеними до Червоної книги, видами, і, водночас, представляють інтерес як цінні технічні, кормові та харчові культури.

Первинним етапом будь-яких біотехнологічних досліджень є введення рослин в асептичну культуру та розробка модифікованих методів їхнього культивування, масового розмноження та ініціації певних типів морфогенезу *in vitro*. Оскільки морфогенний потенціал у різних видів Катрану вивчено недостатньо і лише на декількох видах, а для рідкісних представників роду інформація про особливості біотехнології практично відсутня, розробка технологій клонального мікророзмноження *in vitro* та дослідження особливостей їхнього морфогенезу, яким присвячена дисертаційна робота Надії Пушкарьової, є важливим і актуальним дослідженням, спрямованим на збереження фіторізноманіття та пошук раціонального використання цих рослин.

Дисертаційна робота Пушкарьової Надії Олександрівни «Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на

біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*» виконувалась згідно плану наукових досліджень відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України у рамках науково-дослідних держбюджетних тем III-1-15 «Вивчення фізіолого-біохімічних і молекулярно-біологічних особливостей функціонування та успадкування гетеро логічних генів в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0115U000025, від 2014 року), III-5-16 «Розробка біотехнологій отримання природних гетеро логічних сполук в рослинних системах» (№ держ. реєстрації 0116U000635, від 2015 року), а також в рамках підтримки об'єкту національного наукового надбання України «Колекція зародкової плазми рослин флори України та світової флори».

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків. Наукові положення дисертаційної роботи та сформульовані висновки базуються на самостійно отриманому автором фактичному матеріалі, логічно викладені та обґрунтовані отриманими результатами досліджень. Н.О. Пушкарьова у своєму дисертаційному дослідженні використала рослини п'яти видів роду *Crambe* у якості експериментального матеріалу, отримала асептичні культури цих видів, підбрала умови культивування, мікроклонального розмноження, укорінення і адаптації до ґрунтових умов, провела серію біохімічних аналізів та визначила вплив культивування *in vitro* рослин різних видів катрану на їхню генетичну стабільність та біохімічні властивості. Сучасні біотехнологічні, біохімічні та статистичні методи, використані в роботі, також підтверджують обґрунтованість отриманих результатів та зроблених висновків.

Новизна отриманих результатів. Автором *вперше* було введено в культуру *in vitro* рослини видів *Crambe koktebelica*, *C. steveniana*, *C. aspera* та створено колекцію асептичних культур рослин п'яти видів роду *Crambe*, які потребують збереження, *вперше* використано у якості експлантів частини черешка для рослин *C. koktebelica*, *C. steveniana*, *C. aspera*, *C. tataria* та встановлено їх високий морфогенний потенціал, отримано шляхом прямого і непрямого морфогенезу регенеранти з бічної бруньки як первинного експланта, виявлено високу здатність до ризогенезу регенерантів катрану, отриманих з листкових експлантів, показано низьку здатність кореневих експлантів до органогенезу і високу – до калюсогенезу. Також, *вперше* було визначено вміст поліфруктанів, жирних кислот та розчинного

білка у вегетативній масі *in vitro*-рослин *Crambe* і показано вплив умов асептичної культури на генетичну стабільність досліджуваних рослин.

Практичне значення отриманих результатів. Створена в ході виконання дисертаційної роботи колекція асептичних культур рослин катрану є не лише джерелом рослин для збереження генофонду, а й експериментальним матеріалом для подальших наукових досліджень цих видів. Розроблені протоколи мікроклонального розмноження рослин роду *Crambe* можуть бути використані для масового розмноження з метою повернення в природу чи використання їх у народному господарстві як лікарських, кормових, технічних культур.

Рекомендації щодо подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень. Розроблені автором технології мікророзмноження, укорінення і адаптації отриманих регенерантів дають можливість подальшого дослідження в контрольованих умовах фізіологічних особливостей регуляції синтезу вторинних метаболітів, стійкості до стресів, а також відбору високопродуктивних ліній, створення нових сортів з підвищеною харчовою цінністю тощо. Отримані результати біохімічних досліджень можуть бути застосовані як при отриманні біологічно активних речовин, так і при прогнозуванні реакцій досліджуваних рослин на умови культивування в асептичній культурі та при вирощуванні за умов культури ґрунтової. Таким чином, отримані в дисертаційній роботі результати відкривають нові напрямки для подальшого дослідження рослин різних видів катрану як з природоохоронної, так і з господарчої точки зору.

Повнота використання в роботі наукової літератури у даній галузі. Список використаних літературних джерел складається з 185 посилань, більша частина яких – публікації в іноземних виданнях, що дозволило автору максимально повно висвітлити сучасний стан досліджуваної проблеми в світі.

Оцінка наукової та літературної якості матеріалу і стилю дисертації та автореферату. Дисертаційна робота Пушкарьової Надії Олександрівни оформлена згідно вимог ДАК МОН України і викладена на 155 друкованих сторінках, містить 21 таблицю і 44 рисунки. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, матеріалів

та методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків, списку використаних джерел та додатків.

У вступі автор обґрунтовує актуальність та сучасний стан біотехнологічних досліджень, спрямованих на збереження рослинного різноманіття, зокрема на збереження представників роду *Crambe*, серед яких багато рідкісних видів, які, водночас, мають широкий спектр застосування у харчовій, хімічній, лакофарбовій промисловості, можуть бути використані для очищення стічних вод від важких металів, а також можуть бути джерелом біопалива. Також деякі види катрану можуть бути використані як генетичний матеріал для покращення сільськогосподарських культур. Дисертант наголошує, що розробка технологій розмноження рослин катрану в поєднанні з поглибленням розуміння механізмів впливу умов культивування *in vitro* на їхній ріст, розвиток, генетичну стабільність та біохімічні процеси є необхідними умовами для збереження досліджуваних видів в культурі та відтворення їх популяцій у природі.

Розділ 1 дисертації присвячений огляду літератури, у якому висвітлено інформацію про шляхи збереження видового різноманіття, охарактеризовано біотехнологічні методи збереження фіторізноманіття та специфіку їхнього застосування для збереження видів роду *Crambe*. Також в огляді літератури охарактеризовано рослини роду *Crambe* з точки зору їхнього поширення, практичного застосування, заходи збереження рідкісних видів роду *in situ* та *ex situ*, результати світових розробок з вирощування видів катрану *in vitro*. У розділі приділено увагу впливові умов асептичного культивування рослин на їхню генетичну стабільність та біохімічні властивості, дослідження яких необхідне для кращого розуміння механізмів пристосування їх до стресу.

У розділі 2 «Матеріали та методи досліджень» автор надала ботанічну характеристику досліджуваних у роботі видів роду *Crambe*, навела методики введення в культуру *in vitro* та отримання асептичних культур катрану, мікроклонального розмноження, укорінення та адаптації мікропагонів до ґрунтових умов, оцінки впливу умов культивування *in vitro* на біохімічні властивості рослин досліджуваних видів (визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка, вмісту поліфруктанів та жирних кислот). Дисертант також детально описала методи молекулярно-генетичного аналізу, використані для

визначення генетичної стабільності культивованих *in vitro* рослин. У розділі також зазначені методи статистичної обробки результатів, які були використані у роботі. Логічно та раціонально підібрані методики дозволили автору провести завершене дослідження і виконати поставлені у роботі завдання.

У розділі 3 «Результати досліджень та їх обговорення» Н.О. Пушкарьова представила та проаналізувала всі отримані результати, описавши їх у п'яти підрозділах. Автор розробила оптимальну послідовність поверхневої стерилізації та модифіковану методику пророщування насіння п'яти видів катрану, що дало можливість ввести рослини в асептичну культуру. Дисертантом було досліджено можливість використання різних експлантів для ініціації різних типів морфогенезу і виявлено вищу морфогенну здатність листків, черешків і пазушних бруньок, порівняно з морфогенною здатністю кореневих експлантів, проте здатність коренів до калусогенезу була найвищою. При дослідженні впливу культивування *in vitro* на біохімічні характеристики рідкісних видів катрану автором дисертації було виявлено, що зміни біохімічного складу мають видоспецифічний характер. Автором встановлено також підвищену антиоксидантну активність у чотирьох з п'яти досліджуваних видів, що підтверджується даними, отриманими іншими дослідниками. Надія Пушкарьова виявила, що у асептичних рослин переважав вміст насичених жирних кислот, а у септичних переважав вміст ненасичених, що, на думку дисертанта, пояснюється захисною реакцією рослин у відповідь на нестабільні умови зовнішнього середовища. Крім того, у *in vitro*-рослин вміст жирних кислот був сталим, що дозволяє використовувати асептичні культури як стабільне джерело певних жирних кислот. Проведений Н.О. Пушкарьовою молекулярно-генетичний аналіз досліджуваних рослин катрану показав відносну генетичну стабільність рослин, культивованих *in vitro*, хоча автор вважає, що не виключена і можливість виникнення мутацій під впливом жорстких умов введення в асептичну культуру.

Узагальнення результатів, виконане автором після їхнього повного представлення в роботі, дозволяє оцінити цілісність проведеного дослідження, визначити найважливіші висновки з точки зору теоретичного використання та практичного застосування. Водночас, узагальнення висвітлює нові можливі напрямки досліджень.

Висновки, сформульовані дисертантом, обґрунтовані результатами експериментальних досліджень, відповідають меті і завданням дисертації.

Автореферат відповідає змісту дисертації.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях та наукових виданнях, затверджених ДАК МОН України. Основні положення дисертаційної роботи відображені у 14 наукових працях, у тому числі у 7 статтях у фахових наукових журналах. Результати апробовані на 7 міжнародних наукових конференціях та симпозиумах та представлені у вигляді 7 тез доповідей і матеріалів конференцій.

Зауваження до дисертаційної роботи.

1. На нашу думку, у «Огляді літератури» інформація викладена дещо непослідовно – можливо, варто було б об'єднати всі пункти, які стосуються проблем збереження фіторізноманіття загалом, *in situ* та конкретно роду *Crambe*, в один, все, що стосується культури *in vitro*, в другий, а третім залишити останній пункт про вплив асептичних умов на біохімічні властивості та генетичну стабільність рослин.

2. Розлогу ботанічну характеристику рослин-об'єктів досліджень, яку подано у «Матеріалах і методах», доцільно було б подати в огляді літератури, а в «Матеріалах» дати характеристику основного вихідного матеріалу, який використовувався при введенні рослин в культуру – насіння видів катрану, можливо – з фотографіями насінин. До речі, у авторефераті вказано, що ботанічна характеристика досліджуваних видів наведена у огляді літератури.

3. Для кращого порівняння морфогенного потенціалу різних експлантів у різних видів катрану у роботі не вистачає об'єднаних графіків чи діаграм, які б дозволили порівняти морфогенну здатність не лише експлантів одного виду, а зробити й міжвидове порівняння.

4. Вказане в роботі практичне значення отриманих результатів розкрито неповністю і сформульоване неконкретно: потрібно було б зосередитись не лише на тому, що зроблено (колекцію, розроблені протоколи мікроклонування тощо), а і на тому, де це можна застосувати.

5. Висновки відображають поставлені в роботі завдання, але, в більшості, сформульовані як констатація факту: опрацьовано методи, розроблено протоколи,

визначено умови мікророзмноження, проведено адаптацію. У висновках необхідна інтерпретація результатів, визначення найбільш вагомих з них.

6. У роботі зустрічаються граматичні, стилістичні, технічні помилки, наприклад, у переліку скорочень двічі згадується ПЛР, у деяких словах пропущені літери або є зайві.

Вказані зауваження не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертаційна робота Н. О. Пушкарьової є цілісним завершеним науковим дослідженням, головне завдання якого – підбір і оптимізація методів асептичної культури рідкісних і зникаючих видів роду *Crambe* флори України – виконане повністю на високому науковому рівні.

Вважаю, що дисертація «Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*» за своєю актуальністю, методами дослідження, обсягом виконаної роботи, теоретичним і практичним значенням отриманих результатів відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її автор, Пушкарьова Надія Олександрівна, заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Офіційний опонент,
науковий співробітник
НДЛ «Інтродукованого та природного фіторізноманіття»
ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
кандидат біологічних наук

А.В. Голубенко

Голубенко А.В.

зав. секцією

ст. пр. ВК

