

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Мацкевича Вячеслава Вікторовича «Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація», представлену на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво

Актуальність теми. Однією з основних умов ефективного ведення сільського, лісового господарства є створення науково-обґрунтованої системи насінництва, розсадництва, оскільки без високоякісного садивного матеріалу практично неможливо одержувати максимальну продуктивність рослин. Насамперед – це необхідність використання оздоровленого вихідного матеріалу, тобто, вільного або значною мірою вільного від вірусної інфекції.

Незважаючи на невирішеність багатьох як теоретичних, так і практичних проблем у безвірусному насінництві, широкомасштабне розмноження і оздоровлення сільськогосподарських, лісових і декоративних культур залишається першочерговим завданням насінництва, оскільки, на сьогодні немає альтернативного шляху отримання високоякісного насінневого матеріалу. Враховуючи широке використання та високу ефективність біотехнологічних методів актуальною є розробка надійних алгоритмів створення виробничих протоколів мікроклонального розмноження із залученням в процес безпечних і дієвих детермінант.

Тема докторської дисертації Вячеслава Вікторовича відповідає перспективним напрямкам розвитку насінництва.

Висновок щодо актуальності роботи підтверджується її зв'язком з тематикою наукових досліджень кафедри лісівництва, ботаніки і фізіології рослин Білоцерківського національного аграрного університету в 2013–2017 рр. «Удосконалення існуючих та розробка нових методів клонального мікророзмноження та постасептичної адаптації рослин *in vitro* (номер державної реєстрації 0199U000736), «Фізіологічні основи постасептичної адаптації деревних рослин» на 2017–2021 рр. (номер державної реєстрації 0117U004672), «Удосконалення існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур» на 2017–2021 рр. (номер державної реєстрації 0117U004673).

Метою дослідження опонованої дисертаційної роботи було визначення фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей, які проявились у процесі культивування *in vitro*, та розроблення теоретико-експериментального обґрунтування оптимізації технологічного процесу культивування видів рослин *in vitro*, *ex vitro*.

Мета, задачі, об'єкт, предмет і результати експериментальних досліджень відповідають темі, змісту та висновкам дисертації.

Основні наукові положення, висновки і рекомендації, сформульовані в дисертації, їх новизна, рівень обґрунтованості та достовірності.

Наукова новизна одержаних результатів. Дисертантом отримані наступні основні наукові результати: теоретично обґрунтовано удосконалені та нові підходи вирішення проблеми специфічності прояву інтегральних та кореляційних зв'язків між окремими органами рослин *in vivo*, *in vitro*, *ex vitro* через дослідження фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей на кожному з етапів мікроклонального розмноження численних, систематично різноякісних ботанічних видів рослин, включаючи введення експлантів у асептичні умови, ювенілізації та онтогенетичної різноякісності рослин *in vitro*, детермінації онтогенезу регенерантів і постасептичної адаптації.

Вперше в Україні:

- з урахуванням біологічної специфічності культур, які вводились *in vitro*, розроблено методичні підходи застосування, як деконтамінантів біоциду PPM – PlantPreservativeMixture™ (5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0,1350 % і 2-methyl-3(2H)-isothiazolone 0,0412 %) та Бланідас 300 (натрієва сіль дихлорціануронової кислоти 80,52 %);

- розроблено комплексний підхід деконтамінації регенерантів залежно від місця та типу контамінації, виду рослин, включаючи їх здатність протистояти некротизації тканин;

- відпрацьовано комплекс заходів коригування забезпеченості рослин *in vitro* регуляторами росту, включаючи їх наявність у донорів та специфічність реакції видів рослин на їх співвідношення;

- на підставі експериментальних даних вперше запропоновано гіпотезу про детермінуючий вплив на ювенілізацію різних типів живлення, включаючи гетеротрофне, рівня аерації, наявності в живильному середовищі гормонів;

- науково обґрунтовано підходи керування утворенням у регенерантів фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань залежно від біологічних особливостей видів рослин, складу живильного середовища, використання пересадок, площі раневої поверхні, спеціальної підготовки експлантів;

- розроблено підходи для керування онтогенезом рослин *in vitro*, включаючи тривалість фотоперіоду, спектр світла, температурний режим, співвідношення регуляторів росту, забезпеченість речовинами для автотрофного живлення;

- підтверджено зв'язок ювенілізації рослин *in vitro* зі зміною прояву морфологічних ознак, зокрема фотосинтезуючих органів;

- досліджено процес гіпергідратації в рослин *in vitro*, створено модель причин її виникнення залежно від біологічних особливостей рослин та регулювання процесу зміною концентрації цитокінінів, етилену та кислотності живильного середовища;

- для окремих видів рослин апробовано використання, як гелеутворювачів, джерел автотрофного живлення картопляного крохмалю та картопляного екстракту замість агару, сахарози;

- для трьох культур: картоплі, хости і павловнії розроблено метод постасептичної адаптації шляхом введення рослин *in vitro* в стан спокою. У

картоплі таким органом виявились мікробульби, включаючи одержані методом «культури одного вузла», а в павловнії це досягалось зниженням вологості з 70–75 % до 30–35 % і температури з 22–24 °С до 6–8 °С впродовж 60 діб;

- на прикладі фундука обґрунтовано застосування фотоавтотрофного методу мікроклонального розмноження;

- доведено ефективність заміни хелатної форми заліза в середовищі Мурасіге і Скуга на добриво Ferrilene 4.8 Orto – Orto, що в процесі вирощування ожини знизило частку хлоротичних, вітрифікованих рослин та збільшило кількість пагонів у конгломераті, а в сортів картоплі збільшило висоту рослин, довжину кореневої системи, прискорило початок утворення столонів та бульб.

Набули подальшого розвитку:

- положення про соматоклональну мінливість експлантів, індуковану утворенням травматичного калюсу та екзогенними гормонами, що проявилось через зміну забарвлення листків, їх морфології;

- вплив на онтогенетичну різноякісність рослин *in vitro* павловнії, картоплі, хризантеми, гвоздики, хости походження живців. Перевагу мали регенеранти з апікальної, медіальної частини стебла, порівнюючи з базальною. Після 4–5 живцювання різниця експлантів від перших двох нівелювалась;

- положення про можливість зниження фітотоксичності цитокініну БАП, через додавання в живильне середовище гібереліну (2,5 мг/л), що дозволило збільшити висоту регенерантів павловнії на 24 см, або в 1,6 раз та знизити кількість вітрифікованих рослин на 52 %. У деревовидних видів: падуб, цитофортунелла оптимальним виявилось поєднання БАП та гібереліну по 2,5 мг/л.

Практичне значення одержаних результатів полягає в можливості використання теоретико-методичних положень і практичних рекомендацій щодо промислових технологій прискореного розмноження з використанням культури тканин 6 трав'янистих, 5 чагарникових та 12 деревних видів рослин, а для хости, агапантуса, туї західної, картоплі, малини, ожини, актинідії, аличі, сливи, персика та його підщеп, павловнії розроблені протоколи МКР та постасептичної адаптації.

Доведено перспективність використання гібереліну для обробки материнських рослин та пагонів рослин-донорів для виходу з глибокого спокою. Для хости, троянди, ожини, павловнії оптимальна концентрація розчину становить 0,01–0,1 %.

Виявлено, що краще приживлення експлантів актинідії, менш інтенсивне фенолоутворення відбувається влітку, а в павловнії – наприкінці грудня–початку січня.

Для захисту від внутрішнього контамінування рекомендовано додавати у живильне середовище термостабільні антибіотики: левоміцетин (250 мг/л), чи гентаміцина сульфат (160 мг/л). Кращим варіантом було їх поєднання (125 і 80 мг/л).

Зменшення фенолоутворення та покращення приживлення експлантів можна досягти їх зануренням у антиоксидантні розчини (перші 60 хв. аскорбінова кислота, 200 мг/л + цистеїн, 5 мг/л та наступні 60 хв. – розчин полівінілпіролідон, 10 г/л).

Доведено перевагу за приживленням експлантів агапантуса, висотою пагону та їх кількості в кущі використання рослин-донорів 90 – добового віку проти 30 і 45 добового. У туї західної це стосувалось донорів-живців віком 60 діб проти 20.

Максимальну кількість пагонів у конгломераті павловнії можна досягти за концентрації в середовищі БАП 1,5 мг/л, у розетці смородини – 1,0 мг/л препарату, а малини – 0,5 мг/л на фоні 0,25 мг/л ІМК.

Обґрунтовано вплив цитокінінів на бульбоутворення *in vitro* картоплі. Максимальний вихід мікробульб (162–171 % проти 71 % у контролі) спостерігався у варіантах з аденіном (20 або 25 мг/л) та поєднання аденіну (20 мг/л) з кінетином (1 мг/л) за культивування в темноті. На середовищі з 20 мг/л аденіну мала місце найнижча вітрифікація рослин: 1,1 % проти 1,4 в контролі.

Виявлено, що заміна в середовищі для регенерації хости ІОК (у межах 1-5 мг/л) на ІМК (1–5 мг/л) прискорила коренеутворення в крайніх варіантів сорту Патріот у 2,1–3,1 раза, а Паульс Глорі – 1,6–2,3. Зі зростанням концентрації ІМК збільшувалась довжина коренів за оптимальної у варіанті з концентрацією 4,0 мг/л, а також кількість коренів з найвищим проявом показника за концентрації 2,0 мг/л.

Розроблено положення про можливість заміни активованого вугілля на деревне, що позитивно вплинуло на збільшення довжини коренів у сорту хости Патріот з 14,3 до 37,3 мм, а в сорту Паульс Глорі, відповідно, з 7,7 до 38,9 мм, що не спостерігалось щодо кількості коренів, коли різниця між варіантами, залежно від концентрації ІМК, виявилась неістотною.

Виявлено вплив кислотності живильного середовища на онтогенез регенерантів. Підвищення її до рН 4,0 у смородини чорної спричиняло симптоми дефіциту магнію, фосфору та калію. За рН 7,0 на нижніх листках відмічено ознаки нестачі азоту, а на верхніх – заліза. У агапантуса рН 4,0 спричиняло вітрифікацію регенерантів за першого пасажу у 43 % регенерантів, а за третього – 92 %.

Матеріали дисертаційної роботи апробовано під час читання курсів «Фізіологія рослин», «Основи біотехнології рослин» у Білоцерківському національному аграрному університеті, а також впроваджено в навчальний процес інших навчальних закладів України.

Практичне значення і ефективність розробки протоколів удосконалення технологій мікроклонального розмноження знайшло підтвердження в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, Інституті картоплярства НААН України, Білоцерківському національному аграрному університеті, ТОВ “Колосія”, Закарпатської області, ФГ “Ягідне МС” Вінницької області, ФГ Беррі Фарм Юкрейн Волинської області.

Достовірність одержаних результатів визначається високим методичним рівнем досліджень, проведенням дисперсійного та регресійного аналізів отриманих експериментальних даних. Автором дисертаційної роботи, ґрунтуючись на отриманих експериментальних даних, з використанням рівнянь регресії та показників НІР сформульовані достовірні основні наукові положення, висновки та рекомендації для практичного використання.

Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях. Основні наукові положення, висновки та результати дослідження викладено в 59 наукових працях, з них одна монографія, один підручник, 31 стаття, у тому числі 25 у фахових виданнях із сільськогосподарських наук України та шість закордонних, з яких одна у виданні включеному до наукометричної бази даних Scopus. Обсяг друківаних робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук.

Оцінка змісту, мови і стилю дисертаційної роботи та її завершеності в цілому. Структура дисертаційної роботи побудована логічно, вирішення поставленої мети та сформульованих завдань досліджень дозволили отримати експериментальні дані, сформулювати конкретні висновки та рекомендації для практичного використання.

Дисертація в цілому є завершеною науковою працею, містить необхідні структурні елементи: вступ, 8 розділів, висновки, рекомендації для практичного використання, список використаних джерел, додатки. Загальний обсяг дисертації становить 478 сторінок, із них 402 сторінки основного тексту. Робота містить 128 таблиць та 155 рисунків. Список використаних джерел налічує 344 найменувань. У **вступі** Мацкевич В.В. обґрунтував актуальність теми дисертації, сформулював мету і задачі досліджень, виклав наукову новизну та практичну значимість отриманих результатів.

Текст дисертації та автореферату написано українською мовою, науковим стилем, аргументовано, логічно, доступно для читання.

В першому розділі “Біотехнологічні методи в насінництві рослин” виконано аналітичний огляд широкого кола наукових питань по усіх чотирьох етапах мікроклонального розмноження, що надало можливість здобувачу обґрунтувати актуальність, мету та завдання дисертаційної роботи. Автор глибоко та різнобічно охарактеризував проблеми, які стримують промислове впровадження біотехнологічних методів в насінництві.

В розділі “Умови, матеріали та методика проведення досліджень” вказано, що дослідження проводилися в Білоцерківському національному аграрному університеті МОН України, ТОВ «Колосія» Закарпатської області та ФГ "Беррі Фарм Юкрейн" Волинської області.

В експеримент залучали види рослин, які належать до різних ботанічних та життєвих форм. Викладено за етапами МКР загально прийняті та модифіковані автором методики. З нових в Україні методів, зокрема, описано основні підходи фотоавтотрофного мікроклонального розмноження.

Третій розділ “Відбір та введення експлантів в асептичні умови” присвячений дослідженням, на основі яких обґрунтовано шляхи вирішення проблем першого етапу мікроклонального розмноження – введення та первинне асептичне культивування. Підібрано технологічно оптимальні деконтамінанти (РРМ, Бланідас 300) та розроблено підходи в застосуванні антибіотиків і фунгіцидів для усунення ендогенного контамінування. Обґрунтовано систему заходів із інтоксикацією продуктами окислення фенолоподібних речовин.

В четвертому розділі “Ювенілізація *in vitro*” на основі експериментальних даних розширено наукові знання стосовно набуття чи втрати ознак ювенільності, зміна регенераційного потенціалу як особливості реакції рослин на культивування *in vitro*, що притаманні усім етапам МКР. Доведено вплив гетеротрофного живлення на прояв ювенільності за мікроклонального розмноження. Встановлені закономірності знайшли своє застосування за удосконалення етапів мультиплікації *in vitro* та живцювання *ex vitro*.

В п'ятому розділі “Різноманітність рослин *in vitro*” дисертант встановив, що різноманітність регенерантів, вирощених за однакових умов *in vitro*, включаючи елементи живлення, може мати такі причини: використання експлантів (живців) ізольованих з різних ділянок вихідних рослин-донорів; різний вік вихідних рослин-донорів експлантів; неоднакова кількість субкультивувань донорів експлантів у асептичних умовах.

В шостому розділі “Детермінація онтогенезу регенерантів в процесі МКР” встановлено наступне: синергічний вплив фізичних, хімічних детермінант; встановлено індукуючий вплив гормональних детермінант за культивування вихідних для розмноження рослин. На низці культур розширено знання про ефект накопичення фітотоксичності надлишку гормонів за тривалого субкультивування. Підібрано трофічні й гормональні детермінанти без прояву фітотоксичності. Розроблено практичні заходи боротьби усунення фітотоксичності надлишку цитокінінів додаванням гіберелінів, запобіганню гіпергідратації та отруєння етиленом. Розроблено прописи живильних середовищ для МКР картоплі, ожини, малини, павловнії, ківі, хости, персика.

В сьомому розділі “Постасептична адаптація рослин *in vitro*” досліджено: детермінанти ризогенезу, прийоми захисту від патогенів на етапі *in vitro* - *ex vitro*; вплив субстратів на приживлення рослин *in vitro*. Розроблено технологічні підходи для постасептичної адаптації: фотоавтотрофний метод МКР як шлях розмноження і одночасної адаптації; метод введення в стан спокою, як новий метод постасептичної адаптації насінневого матеріалу, отриманого із застосуванням культури тканин.

У восьмому розділі “Протоколи удосконалених технологій МКР та постасептичної адаптації” запропоновано для практичного використання протоколи МКР наступних культур: хоста, туя західна, агапантус, картопля, малина, ожина, актинідія, алича, слива, персик, підщепа персика, павловнія. За послідовністю їх виконання вони поділені на чотири групи: 1) добір

материнських рослин, деконтамінація експлантів і первинне культивування; 2) розмноження *in vitro*; 3) укорінення *in vitro/ex vitro*, 4) постасептична адаптація.

У висновках та рекомендаціях для практичного використання узагальнено результати досліджень з обґрунтування та наукового вирішення актуальної проблеми використання мікроклонального розмноження численних видів рослин *in vitro* для звільнення від різного виду інфекцій, збереження в стані ювенілізації з урахуванням специфічного прояву їх біологічних особливостей, включаючи добір рослин-донорів для введення в стерильну культуру, деконтамінацію експлантів та специфічність первинного культивування, а також збереження в культурі *in vitro*, активізування процесів ризогенезу, швидкого розмноження і постасептичної адаптації.

Дискусійні положення та зауваження щодо дисертаційної роботи.

В цілому позитивно оцінюючи дисертаційну роботу Вячеслава Вікторовича Мацкевича, можна відмітити такі недоліки, які потребують пояснення автора у порядку дискусії.

1. Вислів автора «доведено ефективність заміни хелатної форми заліза в середовищі Мурасіге і Скуга на добриво Ferrilene 4.8 Orto – Orto» (с. 24) не зовсім вдалий, оскільки це добриво також є хелатом заліза.

2. Доцільно було б подати узагальнені таблиці порівняння характеристик і випробування деконтамінантів, використаних в дослідженнях.

3. Необхідно було б в “Перелік умовних позначень” додати наступні терміни – регенерант, соматоклон, контамінування, детермінація, деконтамінація, мультиплікація, термоіндукція, вітрифікація, гіпергідратація та інші специфічні терміни.

4. Автор ділить МКР на чотири етапи, бажано було б подати посилання на нормативні документи стосовно такого поділу (ДСТУ або ISO). Також в розділі 8 варто вказати середню тривалість вказаних етапів.

5. В дослідженнях зустрічаються модифіковані живильні середовища, але недостатньо вказано якими складовими деякі з них відрізняються від базових.

6. В своїх дослідженнях в результаті мутацій регенерантів дисертант отримав соматоклони. Однак, не зазначено про їх цінність та подальше використання.

7. За дослідження першого етапу МКР автор не приділив достатньої уваги оздоровленню рослин від патогенних мікроорганізмів, зокрема культурі меристем.

8. Отримані результати можуть бути в подальшому використані для наступних дослідницьких робіт з МКР, тому бажано було б вказати і перспективи подальших досліджень.

9. Для практичних рекомендацій і висновків доцільно було обрати більш лаконічний виклад.

10. Відсутній опис новосинтезованих гормонів з цитокініноюю та ауксиноюю активністю, відповідно, Д-9 та Д-18.

11. Додатки А та В на с. 473 та 475 абсолютно ідентичні.

12. Автору не вдалось уникнути русизмів та висловів, що порушують зміст наукового стилю дисертації. В тексті присутні друкарські помилки (“етермінація”, с. 17), неточності (рис. 6.17. на ст. 207 вказана концентрація “0,75 мг/л” але не згадується якої речовини).

Зазначені недоліки, однак, не применшують значущість дисертаційної роботи В.В. Мацкевича для сільськогосподарської науки і практики.


Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації. Зміст автореферату є ідентичним до змісту дисертації і достатньо повно відображає основні положення дослідження.

Загальний висновок. Дисертаційна робота **Вячеслава Вікторовича Мацкевича «Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація»** є завершеною науковою працею, виконана на високому науково-методичному рівні, в якій наведено теоретичне узагальнення та вирішення поставленої наукової проблеми. Проведені дослідження мають вагомое теоретичне та практичне значення. Теоретичний рівень підготовки **Мацкевича Вячеслава Вікторовича** високий, відповідає науковому ступеню доктора сільськогосподарських наук.

Дисертаційна робота «**Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація**» відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів № 567 від 24 липня 2013 р., а її автор – **Вячеслав Вікторович Мацкевич** заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.


Офіційний опонент:

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник,
завідувачка відділу біотехнології,
овочевих культур та картоплі Інституту
зрошеного землеробства Національної
академії аграрних наук України

 Г. С. Балашова

Підпис Г.С. Балашової засвідчую:

Провідний спеціаліст по кадрам

 О.І. Жақун

11.01.2021 р.