

ВІДЗИВ

офіційного опонента, доктора біологічних наук, професора Скляр Вікторії Григорівни на дисертаційну роботу **Мацкевича Вячеслава Вікторовича** «Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація», подану до захисту до спеціалізованої вченої ради Д 55.859.03 при Сумському національному аграрному університеті МОН України на здобуття наукового ступеня доктора с.-г. наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво

Актуальність теми. Дисертаційна робота Мацкевича В. В. присвячена теоретичному обґрунтуванню та практичній реалізації важливої наукової та практичної проблеми – використання тотипотентності клітин, тканин і органів рослин для мікроклонального розмноження. Це принципово новий підхід у насінництві рослин, який дозволяє вирішувати також екологічні, економічні та інші завдання, які виникають перед людством.

Незважаючи на те, що новий підхід у розмноженні рослин започаткований у середині минулого століття, на думку численних вчених багато фізіологічних, технологічних проблем доводиться вирішувати постійно. Це, зокрема, обмовлено багатоетапністю робіт та проявом особливостей залежно від біологічної специфічності видів рослин. Окрім того, технічний прогрес також вносить свої зміни у технологію мікроклонального розмноження, що дозволяє удосконалювати технології вирощування рослин *in vitro*, здешевлювати їх.

Розв'язування завдань сьогодення з метою інтенсифікації використання методу, розкриття нових взаємовідносин за культивування *in vitro* ще надовго будуть актуальними проблемами мікроклонального розмноження рослин.

У дисертації викладені результати досліджень, виконаних особисто Мацкевичем В. В. у Білоцерківському національному аграрному університеті Міністерства освіти і науки України, ТОВ «Колосія» Закарпатської області, ФГ «Беррі Фарм Юкрейн» Волинської області впродовж 2005-2020 років. Вони виконувались у відповідності із завданнями НДР «Удосконалення існуючих та розробка нових методів клонального мікророзмноження та постасептичної адаптації рослин *in vitro* (номер державної реєстрації 0199U00736), «Фізіологічні основи постасептичної адаптації деревних рослин» (номер державної реєстрації 0117U04672), «Удосконалення існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур» (номер державної реєстрації 0117U04673).

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень дисертації.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у теоретичному обґрунтуванні та новому вирішенні актуальної 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: асептичного введення в культуру *in vitro*, ризогенезу, мультиплікації та постасептичної адаптації численних, систематично різноякісних ботанічних видів рослин, включаючи ювенілізацію та онтогенетичну різноякісність рослин *in vitro*, детермінацію онтогенезу регенерантів.

Численні положення відпрацьовані **вперше в Україні**. Це стосувалось процесу асептичного введення об'єктів у культуру *in vitro* шляхом застосування як деконтамінантів біоциду РРМ та Бланідас 300; комплексного підходу до деконтамінації регенерантів залежно від місця та типу контамінації, виду рослин, включаючи їх здатність протистояти некротизації тканин.

Стосовно мультиплікаційного процесу розроблено комплекс заходів коригування забезпеченості рослин *in vitro* регуляторами росту, включаючи їх наявність у донорів та специфічність реакції видів рослин на їх співвідношення, у результаті чого запропоновано гіпотезу про детермінуючий вплив на ювенілізацію різних типів живлення, включаючи гетеротрофне, рівня аерації, наявності в живильному середовищі гормонів. Науково обґрунтований підхід до керування утворенням у регенерантів фенолоподібних речовин під час перших субкультивувань. Розроблено підходи для керування онтогенезом рослин *in vitro*, включаючи тривалість фотоперіоду, спектру світла, температурного режиму, 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 картопляного крохмалю та картопляного екстракту замість агару, сахарози. 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 стolonів та бульб.

З комплексу постасептичної адаптації для трьох культур: картоплі, хости і павловнії запропонований метод адаптації шляхом введення рослин *in vitro* в стан спокою.

Окремі положення дисертаційної роботи набули подальшого розвитку.

Достовірність одержаних результатів базується на результатах багаторічних досліджень, виконаних згідно загально прийнятих методик та вдосконалених у процесі проведення експериментів. Підтвердженням викладеного можуть також бути дані статистичної обробки матеріалу. Достовірність отриманих результатів також підтверджується успішним функціонуванням організованих здобувачем лабораторій мікроклонального розмноження.

Практичне значення одержаних результатів. Зважаючи на те, що у процесі виконання дисертаційної роботи відпрацьовувались не лише теоретичні положення мікроклонального розмноження, а й практичні, дисертація характеризується численними новими підходами у вирішенні практичних завдань. Основною цінністю їх є внесок у технологію мікроклонального розмноження низки видів рослин, окремі з яких вперше запропоновані для вирощування в Україні. Розроблені протоколи, які гарантують успішну практичну реалізацію усіх етапів розмноження рослин *in vitro*.

Численні положення роботи стосуються конкретних поліпшень, пов'язаних з мікроклональним розмноженням, зокрема: використання антибіотиків для знищення внутрішньої інфекції, використання речовин, які знижують фенолоутворення, встановлення оптимального віку, середовища для приживлення та розвитку експлантів, оптимізовано використання фітогормонів для покращення проходження росту та розвитку рослин тощо.

Важливим є підтвердження цінності розробок здобувача за результатами виконання робіт згідно розроблених протоколів у шести науково-дослідних установах та приватних підприємствах.

Повнота викладення основних результатів дисертаційної роботи у наукових виданнях. Основні положення роботи опубліковані в монографії, підручнику, навчальному посібнику, науково-практичних посібниках. Результати досліджень викладені в 31 фаховому виданні, в тому числі шести зарубіжних та однієї статті в журналі, індексованому у науково-метричній базі даних Scopus. Апробована робота також через участь у 22 наукових конференціях, серед яких у двох, які проходили в країнах дальнього зарубіжжя.

Слід відмітити ідентичність викладення результатів експериментів у дисертаційній роботі та авторефераті.

Стиль викладення дисертаційної роботи та автореферату.

Дисертаційна робота містить анотацію українською та англійською мовами, зміст, перелік умовних позначень та термінів, які рідко вживаються, вісім розділів, висновки, рекомендації для практичного використання, список використаної літератури, який нараховує 344 посилання, у тому числі 84 латиницею, додатки. Дисертацію викладено на 478 сторінках машинописного тексту комп'ютерного набору. Вона ілюстрована 128 таблицями та 155 рисунками. За змістом робота повністю відповідає паспорту спеціальності 06.01.05 – селекція і насінництво.

Перший розділ – огляд наукової літератури повністю відображає тему дисертації. У ньому представлений аналітичний огляд джерел літератури вітчизняного та зарубіжного видавництва. За результатами аналізу обґрунтовано висновок до розділу, у якому викладені необхідності виконання експериментів. Його частка у загальному обсязі дисертаційної роботи невелика – 12 %.

У *другому розділі* «Умови, матеріал та методика проведення досліджень» традиційно охарактеризоване місце виконання експерименту, а також об'єкти, охоплені вивченням. Особлива увага звернута на особливості деконтамінування донорів, які використовуються для культури *in vitro*. Цей етап надзвичайно важливий для подальшого успішного виконання експериментів, що обумовлено різноманітністю контамінуючих мікроорганізмів та необхідністю отримати життєздатний матеріал, враховуючи біологічну специфічність видів.

Важливим етапом також є мультиплікація. Особливо це стосується першого субкультивування, зокрема з мінімізацією частин рослин, які вводяться в культуру, стресовими чинниками умов, у які вони переводяться.

Індукція ризогенезу у експлантів на перший погляд не складне завдання, проте слід враховувати специфічність ауксинів, які приймають участь у процесі, а також необхідність додавання в середовище різних добавок, фотоперіод тощо.

Зважаючи на значну особисту участь здобувача, особлива увага приділена фотоавтотрофному мікроклональному розмноженню з оптимізацією всіх складових цього процесу.

Достатньо велика роль відведена постсептичній адаптації, бо саме на цьому етапі великою мірою вирішується ефективність методу. Здобувачем розроблені численні підходи для приживлення пробіркових рослин в умовах *ex vitro*.

У третьому розділі, який є одним з основних: «Відбір та введення експлантів а асептичні умови», описані результати досліджень з урахуванням приживлення експлантів залежно від їх походження, процес деконтамінації, утворення фенольних сполук, а також соматоклональна мінливість.

Залежно від біологічних особливостей рослин виявлено: вплив стану донорів на приживлення експлантів шишшини; ефективну дію гібереліну для виведення зі стану спокою хости, троянди і ожини; оптимальне місце для виділення експлантів; найкращий стерилізуючий комплекс для експлантів хости; найвищий рівень контамінації експлантів, наприклад, у туї західної – стебловий живець, у павлонії – присутність криючих лусок, у хости – бруньки.

Встановлено, що для успішного використання як стерилізуючої речовини біоциду РРМ для ожини і фундука слід повністю занурювати експланти у середовище з концентрацією препарату 2 мг/л. Залежно від життєвої форми концентрація біоциду РРМ для трав'янистих рослин повинна бути 2,0 мл/л, чагарникових – 2,5, а деревних – 3,0 з точки зору стерилізації та 2,5 мл/л для отримання живих експлантів.

Виявлено, що у туї західної, міскантуса, кактусів, актинідії, фундука і ліщини за перших субкультивувань утворюються фенолоподібні речовини, які ускладнюють приживлення експлантів. Для усунення цього явища у туї західної слід використовувати живці з «п'яткою», а у середовище додавати аденін (20 мг/л) та аскорбінову кислоту (15 мг/л). У міскантуса дійовим заходом є видалення відмерлих листків, а актинідії – використання верхівкових експлантів та занурення їх на 60 хв. у антиоксидантний розчин (200 мг/л аскорбінової кислоти та 5 мг/л цистеїну), а потім на 60 хв. у розчин полівінілпіролідону (10 г/л).

Найбільш часто соматоклональна мінливість за культивування *in vitro* мала місце в калюсній культурі і проявилась у зміні забарвлення, уповільнення росту та зменшення кількості листків у пазушних бруньок.

У четвертому розділі викладено експериментальні дані стосовно ювенілізації *in vitro*, що проявляється у найрізноманітніших формах: зміні форм фотосинтетичних органів, утворенні запасуючих органів, відмінностях у живленні тощо.

Доведено, що у туї західної тільки ювенільна форма може використовуватись для субкультивувань впродовж 11 разів і більше. На прикладі картоплі, гвоздики встановлено вплив на ювенілізацію гетеротрофного живлення, що проявляється у зміні форми фотосинтезуючих органів.

Генезис листка картоплі, гвоздики залежить від багатьох чинників: трофічної регуляції, онтогенетичного стану, походження експлантів (насінина або брунька) і концентрації поживних речовин, перш за все сахарози. Останній чинник впливав також на загальний ріст і розвиток як надземної частини рослин, так і кореневої системи.

У картоплі особливий вплив на ювенілізацію пробіркових рослин мали аерація та способи живлення. Виявлена біологічна специфічна реакція сортів на формування бульб, їх кількість. Загущене вирощування троянди, смородини спричиняло утворення не ювенільних (простих) листків, а складних.

На ювенілізації *in vitro* хости окрім концентрації елементів живлення відбивалися наявність ІМК, активованого вугілля та консистенція живильного середовища. При цьому кожен із чинників по-особливому впливав на ріст та розвиток культури: зменшення концентрації елементів живлення знижувало кількість листків, вкорочувало та округлювало листові пластинки, негативно впливало на товщину та довжину черешка; останні подовжувались за додавання в середовище ІМК. Оптимальною для хости виявилась концентрація сахарози 2-4 %. Введення вихідних для живцювання рослин хости у стан спокою спричиняло потовщення пагона, всихання листків.

У *п'ятому розділі* висвітлені результати дослідження з різноякісності рослин *in vitro*, що обумовлено численними причинами. Для павловнії регенеранти з верхівки мали більші розміри, прискорювали ризогенез, порівняно з нижче розміщених живців. У картоплі таке спостерігалось до 4-пасажу, після чого різниця за розмірами живців з верхівкової частини та серединної нівелювалась. Аналогічне спостерігалось у гвоздики, хризантеми.

Виявлена можливість зняття апікального домінування в хости шляхом поділу денця, що дозволило скоротити період культивування в 4,5-5,2 рази та збільшило коефіцієнт розмноження у 1,1 рази.

Доведений вплив віку рослин-донорів агапантуса на морфогенез регенерантів. У 30-денних донорів, порівняно з 90-денними, знизилось приживлення експлантів, висота пагонів та їх кількість у кущі. Аналогічне відмічено в туї західної.

У *розділі шість* висвітлені результати досліджень з детермінації онтогенезу регенерантів у процесі мікроклонального розмноження. Специфічність умов *in vitro*, порівняно з *in vivo*, обумовили в павловнії вплив на висоту рослин, кількість пагонів у конгломераті, а також температури повітря та додавання в середовище БАП (1,0 мг/л). Оптимальною виявилась температура 24 °С і, навпаки, за 10°С припиняється елонгація пагона та

індукується перехід у стан спокою. У картоплі детермінація онтогенезу може бути спричинена високою концентрацією сахарози (до 6-8 %), наявністю цитокинінів, низької позитивної температури повітря (близько 4 °C), кількістю та якістю світла і окремих елементів живлення. У комплексі це обумовило «культуру одного вузла», коли бульби зав'язуються без утворення стебла.

Важливу роль *in vitro* відіграла фітогормональна детермінація. Особливо значну роль відведено БАП. Це стосувалось ожини, смородини, верби. Встановлено, що коригування впливу гормону відбувалось за рахунок збільшення концентрації хелатної форми заліза. У павловнії найбільше мікропагонів виявлено за використання білого світла та концентрації БАП 1,5 мг/л, при кислотності середовища 5,6-5,8. Позитивно вплинуло на цей процес поєднання кінетину (0,8 мг/л) та БАП (2,0 мг/л).

Для ківі оптимізацію коефіцієнта розмноження забезпечувало використання БАП (0,25 мг/л) та кінетину (0,5 мг/л). Крім усього іншого, в цьому варіанті зменшилась частка вітрифікованих регенерантів.

Гіберелін ГК₃, порівняно з ГК_{4/7}, більшою мірою впливав на висоту рослин павловнії, майже не спричиняв вітрифікацію рослин, проте кількість конгломератів виявилась найбільшою за використання останнього.

Доведений значний вплив фітогормонів (кінетину, аденіну, ІОК), етилену, кислотності середовища на гідратацію регенерантів ожини, малини, смородини, яблуні, картоплі та визначені їх оптимальні концентрації.

Серед трофічних чинників досліджували вплив гелеутворювачів: агар, картопляний екстракт, картопляний крохмаль, перліт на ріст та розвиток живців картоплі і геланової камеді для мікроклонального вирощування міскантусу. У картоплі цьому також сприяла модифікація складу живильного середовища, зокрема, з використанням заліза.

Розділ сім присвячений постасептичній адаптації *in vitro*, одному з важливих етапів мікроклонального розмноження. Адже, вирощені рослини *in vitro* необхідно адаптувати для подальшого вирощування у зовсім у інших умовах. Для успішного проходження процесу слід проводити підготовку до нього, що зводиться до детермінації в розвитку кореневої системи: використання ІМК (3 мг/л у хости), деревного вугілля, замочування в розчинах фітогормонів. Для павловнії експериментально доведена цінність для детермінації рослин у процесі постасептичної адаптації використання ІМК (2,5 мг/л), середовища QL, збільшення концентрації активованого вугілля (до 3,0 г/л), оптимізації технології приживлення, включаючи підживлення $\text{KN}_2\text{PO}_4 + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Серед добрив із Fe найкращі результати *ex vitro* одержані із застосуванням Ferrilene 4.8 Orto-Orto. Позитивний ефект також отримано від введення рослин у стан спокою.

Доведено, що найкращим субстратом для *ex vitro* у картоплі було використання перліту, а для туї західної – гідро гелю crystal soil. Найкращою площею живлення для рослин картоплі *in vitro* виявилась 12 x 12 см.

Для запобігання поширення грибної та бактеріальної інфекції на рослинах *ex vitro* кращим було замочування рослин, ніж обробка субстрату, а з препаратів найкраще приживлення відбувалося при використанні Превікур Енерджі 840 SL в концентрації 1,5 г/л та експозицією п'ять діб.

Протоколи удосконалення технологій МКР та постасептичної адаптації розроблені для 11-и культур, що дозволило успішно застосовувати їх за мікроклонального розмноження. Ця інформація представлена у восьмому розділі.

Висновки, представлені в роботі, логічно та повно узагальнюють її зміст і результати досліджень.

Зауваження щодо змісту та оформлення дисертації

Незважаючи на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи, необхідно вказати на наявність дискусійних положень, які вимагають додаткового аргументування, а також на недоліки технічного характеру.

Дискусійними є:

1. У розділі 1 перераховані переваги використання біотехнологічних методів у насінництві, розсадництві, проте згадане: «створення генетично змінених форм рослин» (с. 29) не може бути позитивною стороною за отримання однорідного насінневого матеріалу.

2. Вважаємо, що у роботі перераховані не всі переваги мікроклонального розмноження рослин, порівняно з іншими методами (с.30).

3. Оскільки у процесі викладення матеріалу не вказувалось на конкретні переваги методу мікроклонального розмноження для залучених у дослідження видів рослин, необхідно було б вказати це під час характеристики матеріалу досліджень (підрозділ 2.2).

4. У таблиці 2.2 слід було б навести латинську назву видів, бо в роботі іноді робиться посилання саме на неї.

5. У висновку до розділу 3 доцільно було б згрупувати методи, декомінанти залежно від біологічних особливостей видів, залучених у дослідження.

6. Слід було б більш детально описати можливість аерації рослин *in vitro*, бо це пов'язано із проблемою інфікування пробіркового матеріалу.

7. У підрозділі 3.4 «Сомаклональна мінливість» потрібно було більш чітко зазначити про можливість цього явища за мікроклонального розмноження рослин, але, водночас, це є його негативною стороною, хоча як вихідний селекційний матеріал сомаклони цінні.

8. Утворення фенолоподібних речовин, особливо за перших субкультивувань, - це значна перешкода залучення окремих видів до мікроклонального розмноження. Для більшої ясності бажано було б

систематизувати види як за проявом ознаки, так і методами зниження цього ефекту.

9. Прояв ювенілізації під час мікроклонального розмноження рослин надзвичайно цінне явище, але в роботі не вказано ранжирування методів задля її підтримання.

10. Слід було б акцентувати увагу на те, що незважаючи на онтогенетичну різноманітність рослин, отримати однорідний матеріал в процесі мікроклонального розмноження можливо.

11. Не зроблена спроба пояснити вплив розмірів листків на інтенсивність коренеутворення фундука (рис. 7.38).

Зауваження технічного характеру:

1. Перелік умовних позначень закороткий, а окремі (а.в.) не використовувались у роботі.

2. За високої якості переважаючої кількості рисунків, у окремих з них (5.1, 7.34) все ж таки важко зрозуміти суть.

3. Не зовсім вдалим і зрозумілим є вислів: «За третього етапу проблемним є синхронне коренеутворення рослин» (с. 83).

4. На сторінці 84 не вказано ким модифіковане середовище за Мурасіге і Скуга.

5. Для індукції ризогенезу використовували не лише окремі фактори, але і їх поєднання (с. 90).

6. Окремі рисунки не мають масштабу, що дещо ускладнює їх розуміння. У таблиці 3.2 «%» наведений як у назві, так і в кожній із граф, а на рисунках 3.17, 7.35 не наведено одиниці виміру (можна здогадатись, що це %).

7. На рисунку 2.8 вказано «Живцювання регенерантів аронії чорноплідної касети на перліт-вермикулітному субстраті (1:1)», а цей вид не задекларований у дослідженнях.

8. Нерідко дуже близько вживаються однакові слова, наприклад: «Досліди проводили в чотирикратній *повторності* один контейнер із однією касетою *виступав* як одне *повторення*». Крім цього невдале слово «виступав» (с.92).

9. Нерідко зустрічаються ненаукові терміни, наприклад «значно вираженою» (с. 98), «дещо дрібніші листки» (с. 334).

10. Зустрічаються пропуски букв: «обіковували» замість «обліковували» (с. 260); несумісне їх вживання: «За вказаними показниками регенеранти *на* за першого...» (с.274); «при постасептичному» замість «за постасептичного» (с.338); пропущена буква «в» – «один міліграм речовини одному мілілітрі розчинника» (с. 409) та інші.

11. Незважаючи на «Перелік умовних позначень» у тексті, навіть, після першого використання вживаються повні назви сполук: «бензиламінопурину», «індолілмасляної кислоти» (с. 273).

12. Рисунок 7.25 дуже схематичний.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

На завершення необхідно відмітити, що за актуальністю теми, науково-методичним рівнем проведених досліджень, науковою новизною, обґрунтованістю результатів експериментальних даних та висновків і практичних рекомендацій, дисертаційна робота Мацкевича В. В. «Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація» відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів...», які висуваються до дисертації на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри екології та ботаніки
Сумського НАУ МОН України

В. Г. Скляр



Засвідчую:
Проректор з наукової роботи Сумського
національного аграрного університету
Ю.І. Данько
«11» 01 2021 р.