

## ВІДГУК

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

**Актуальність теми досліджень.** Біотехнологічні методи нині широко використовуються у селекції та насінництві переважної більшості сільськогосподарських культур. Проте не достатньо інформації, яка б сприяла розробці науково обґрунтованих підходів створення нових протоколів розмноження культур згідно вимог промислового насінництва. Зокрема, потребує постійного удосконалення метод мікроклонального розмноження рослин за технологічними етапами: введення експлантів в ізолювану культуру; модифікації живильного середовища відповідно виду і генотипу рослинного матеріалу для активації розвитку меристем, розмноження та індукції ризогенезу; постасептичної адаптації матеріалу до умов *ex vitro* тощо.

Прояв морфогенних потенцій клітини за мікроклонування *in vitro* залежить від багатьох чинників, аналіз впливу яких визначає напрямки взаємодії клітин, тканин та органів рослин у процесі онтогенезу в ізолюваній культурі. Відсутність комплексу фундаментальних знань про механізми індукції морфогенезу низки видів культур ускладнює практичне використання біотехнологічних методів, зокрема мікроклонального розмноження, у селекційному та насінницькому процесі як для отримання генетично ідентичного матеріалу, так і змінених форм з новими господарсько цінними ознаками, що зумовлює актуальність поглиблення досліджень у цьому напрямку.

**Дослідження за темою дисертаційної роботи** виконували впродовж 2005-2020 рр. і були складовою частиною тематики досліджень кафедри лісівництва, ботаніки і фізіології рослин «Удосконалення існуючих та розробка нових методів клонального мікророзмноження та постасептичної адаптації рослин *in vitro*» (номер державної реєстрації 0199U000736), «Фізіологічні основи постасептичної адаптації деревних рослин» (номер державної реєстрації 0117U004672), «Удосконалення

існуючих та розробка нових технологічних прийомів мікроклонального розмноження горіхоплідних культур» (номер державної реєстрації 0117U004673).

**Метою роботи** було визначення фізіолого-біохімічних та анатомо-морфологічних особливостей, що проявились у процесі культивування матеріалів *in vitro*, і теоретико-експериментальне обґрунтування оптимізації технологічного процесу мікроклонування різних видів рослин *in vitro* та *ex vitro*.

**Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій та їх достовірність.** Дослідження проведено відповідно до програм та методик, що відповідають меті дисертаційної роботи. Наукові положення за результатами досліджень, висновки і практичні рекомендації обґрунтовані. Аналіз роботи свідчить, що здобувач детально опрацював базу поставлених наукових завдань, спрямованих на теоретичне і методологічне обґрунтування систем мікроклонування різних видів рослин. Усе це дає підставу стверджувати, що висновки і рекомендації дисертації є обґрунтованими і виваженими.

**Наукова новизна одержаних результатів** полягає у теоретичному обґрунтуванні та новому вирішенні актуальної проблеми встановлення специфічності прояву інтегральних та кореляційних зв'язків між окремими органами рослин *in vivo*, *in vitro* та *ex vitro* за дослідження фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних особливостей на кожному з етапів мікроклонального розмноження численних, різноякісних ботанічних видів рослин, зокрема, введення експлантів у асептичні умови, ювенілізації та онтогенетичної різноякісності рослин *in vitro*, детермінації онтогенезу регенерантів і постасептичної адаптації.

*Вперше в Україні:*

за урахування біологічної специфічності культур, що вводили *in vitro*, розроблено методичні підходи застосування, деконтамінантами біоциду PPM - Plant Preservative Mixture™ (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 і здатності протистояти некротизації тканин;

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

вперше запропоновано гіпотезу про детермінуючий вплив на ювенілізацію різних типів живлення, зокрема гетеротрофне, рівня аерації, наявності в живильному середовищі гормонів;

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

розроблено підходи для керування онтогенезом рослин *in vitro*, зокрема, 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 рослин *in vitro*, створено модель причин її виникнення залежно від біологічних особливостей та регулювання процесу зміною концентрації цитокинінів, етилену та кислотності живильного середовища;

- для окремих видів рослин апробовано використання, як гелеутворювачів, джерел автотрофного живлення картопляного крохмалю та картопляного екстракту замість агару і сахарози;
- для картоплі, хости і павловнії розроблено метод постасептичної адаптації за введення рослин *in vitro* в стан спокою, що досягається у картоплі - формуванням мікробульб, зокрема одержаними методом «культури одного вузла», а в павловнії - зниженням вологості з 70-75 % до 30-35 % та температури з 22-24 °C до 6-8 °C 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;
- обґрунтування впливу на онтогенетичну різноякісність рослин *in vitro* павловнії, картоплі, хризантеми, гвоздики, хости походження живців;
- положення про можливість зниження фітотоксичності цитокініну 6-БАП, через додавання в живильне середовище гібереліну (2,5 мг/л), що дозволило збільшити висоту регенерантів павловнії на 24 см, або в 1,6 рази, та зменшити кількість вітрифікованих рослин на 52,0 %. У деревовидних видів (падуб, цитофортунелла) оптимальним виявилось поєднання 6-БАП та гібереліну концентрацією 2,5 мг/л.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено нові практичні підходи вирішення актуальної проблеми сільськогосподарського виробництва — розмноження цінних видів рослин (хости, туї західної, агапантусу, картоплі, малини, ожини, шипшини, троянди, актиніди, павловни тощо) при використанні мікроклонального розмноження *in vitro* за урахування специфічного прояву їх біологічних особливостей, зокрема добір рослин-донорів для введення матеріалу в стерильну культуру, деконтамінацію експлантів і специфічність первинного культивування та збереження стану ювенілізації, процесів ризогенезу, активного розмноження і постасептичної адаптації.

Ефективність розробки протоколів удосконалення технологій мікроклонального розмноження знайшло підтвердження за їх апробації в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України, Інституті картоплярства НААН України, Білоцерківському національному аграрному університеті МОН України та комерційних підприємствах ТОВ “Колосія” Закарпатської області, ФГ “Ягідне МС” Вінницької області, ФГ Беррі Фарм Юкрейн

Волинської області.

**Повнота викладу результатів досліджень в опублікованих працях.** За темою дисертації опубліковано 59 наукових праць, з них 31 стаття, зокрема, 25 - у фахових виданнях України, п'ять - у Міжнародних наукових періодичних зарубіжних виданнях, одна - у науковому виданні включеному до міжнародної наукометричної бази Scopus та 22 тези доповідей наукових конференцій. За результатами роботи, видано одну монографію, один підручник, два навчальних та два науково-практичних посібники.

**Аналіз основного змісту дисертаційної роботи.** Дисертацію викладено на 478 сторінках комп'ютерного набору, зокрема, 402 - основного тексту. Вона містить анотацію українською та англійською мовами, зміст, перелік умовних позначень, вісім розділів, висновки, рекомендації для практичного використання, список використаної джерел літератури з 344 позицій, з яких 84 - латиницею, додатки. Роботу ілюстровано 128 таблицями та 155 рисунками.

У вступі подано всі необхідні елементи загальної характеристики дисертації. Розкрито актуальність теми наукової роботи, її зв'язок з науковими програмами, завданнями, сформульовано мету і завдання дослідження, охарактеризовано методи досліджень, обґрунтовано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, зазначено особистий внесок дисертанта, наведено результати апробації та впровадження досліджень.

*Перший розділ* присвячено огляду наукової літератури за темою дисертації де представлено кваліфікований аналіз стану наукових проблем і теоретичних основ використання біотехнологічних методів для розмноження рослинного матеріалу. На підставі аналізу вітчизняної та зарубіжної літератури зроблено висновок та обґрунтовано необхідність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи.

У *другому розділі* викладено методика досліджень, наведено умови проведення експериментальної частини роботи вцілому та біотехнологічної лабораторії зокрема. Охарактеризовано рослинний матеріал і відмічено відповідність умов для проведення запланованого комплексу досліджень.

У *третьому розділі* викладено результати оптимізації першого етапу

мікроклонального розмноження. Підібрано оптимальні терміни та способи підготовки введення експланту низки видів рослин в ізолювану культуру. Запропоновано основні нові (Бланідас 300, РРМ, суміш перманганату калію і гіпохлориту натрію) і допоміжні (фунгіциди та антибіотики) деконтамінанти та обґрунтовано регламенти їх застосування. Досліджено природу фенолоутворення і розроблено прийоми усунення самоінтоксикації експлантів фенолоподібними речовинами. Виділено та охарактеризовано соматоклональні зразки, що формувалися в першому пасажі з калюсної тканини, за дії мутагенних чинників, якими можуть слугувати стерилізуючі агенти та окремі компоненти живильного середовища.

У *четвертому розділі* дисертант аналізує явище ювенілізації рослин *in vitro*, його природу та використання в первинному насінництві. Зокрема, встановлено, що ювенільність настає при міксотрофному живленні з переважанням гетеротрофного за додавання в живильне середовище сахарози. Визначено вплив на ювенілізацію складу живильного середовища, зокрема

ІМК та активованого вугілля. Встановлено візуальні індикатори набуття і втрати ювенільності матеріалу, що розмножується.

У *п'ятому розділі* викладено результати досліджень щодо онтогенетичної різноякісності матеріалу за розмноженням рослин клонуванням *in vitro*. Дисертант встановив природу онтогенетичної і вікової різноякісності та їх прояв у процесі субкультування. Доведено вплив ендогенних та екзогенних регуляторів росту і зміни корелятивних зв'язків у донорній материнській рослині на ріст і розвиток регенерантів. Встановлено вплив різних за походженням матеріалів на утворення мікроклонів рослин.

У *шостому розділі* визначено основні детермінанти та їх синергитичний вплив на онтогенез рослинних об'єктів. Встановлено особливості прояву трофічних і гормональних детермінантів у поєднанні зі зміною умов культивування.

Обґрунтовано трофічну детермінацію росту і розвитку рослин за кількісним і якісним вмістом мінеральних елементів живлення. Проаналізовано вплив регуляторів росту, зокрема цитокінінів, ауксинів і гіберілінів, як домінуючих елементів у технології прискореного розмноження.

У модельних дослідженнях розроблено заходи попередження отруєння рослинного матеріалу етиленом і гіпергідратацією.

Обґрунтовано використання комплексу детермінантів для регулювання онтогенезу рослин згідно виробничих потреб. Розроблено алгоритми підбору оптимальних умов для мікроклонального розмноження рослинного матеріалу.

У *сьомому розділі* викладено результати досліджень з адаптації рослин за перенесення клонованого матеріалу з умов *in vitro* в умови *ex vitro*. Розроблено прийоми постасептичного розмноження, що дозволяє отримати технологічно високі показники розвитку рослин *ex vitro*. Модифіковано низку живильних розчинів для стимуляції ростових процесів рослинного матеріалу за адаптації.

Доведено ефективність використання удосконаленої технології фотоавтотрофного мікроклонального розмноження, що є одночасно клонуванням і постасептичною адаптацією. Апробований метод знижує затрати та покращує якість посадкового матеріалу.

У *восьмому розділі* запропоновано протоколи технології мікроклонального розмноження низки культур, зокрема хости, туї західної, агапантусу, картоплі, малини, ожини, актинідії, аличі, сливи, персика, підщепи персика, павловнії. Показано доцільність використання їх для розмноження та отримання запрограмованої кількості рослинного матеріалу.

Кожен з розділів закінчується резюмуючим проміжним висновком, що дало змогу автору сформулювати основні висновки, показати наукову та практичну цінність проведених досліджень і зробити рекомендації виробництву.

Експериментальний матеріал та висновки, наведені в авторефераті, ідентичні з дисертаційною роботою.

### **Дискусійні положення дисертаційної роботи.**

Поряд з цими та іншими позитивними положеннями дисертаційної роботи слід зазначити і деякі дискусійні питання та зауваження:

1. В анотації досить стисло викладено результати проведених досліджень.
2. В огляді літератури проаналізовано незначну кількість джерел за останніх

п'ять років.

3. Наукову новизну необхідно було конкретизувати відповідно розроблених технологій та підтвердити цифровим матеріалом.
4. У науковій новизні не вказано який технологічний процес було *удосконалено*.
5. Для підтвердження наукової новизни розроблені технології та живильні середовища необхідно патентувати.
6. Практичне значення одержаних результатів доцільно було доповнити розробленими регламентами технології мікроклонування досліджуваних видів рослин.
7. Живильні середовища не «відмінюють» від базових прописів, як вказує автор, а модифікують, оптимізують чи доповнюють окремими компонентами.
8. За мікроклонального розмноження рослин доцільно вживати терміни «клонування», «клони» замість «живцювання», «живці».
9. За окремими видами рослин автором не вказано базові живильні середовище, що модифікували для активації розвитку меристем, розмноження та ризогенезу клонованого матеріалу.
10. Окремі таблиці та рисунки роботи не мають статистичного аналізу даних (табл. 3.4, 3.7, 3.14..., рис. 3.10, 3.11, 3.13...), що ускладнює визначення істотності різниці між варіантами досліджу.
11. Висновки і рекомендації для використання потребують конкретизації та зменшення багатослів'я.
12. Окремі джерела літератури оформлено з відхиленням від методичних вимог.
13. У роботі зустрічаються орфографічні та стилістичні помилки (стор. 20, 24,25...).

Проте відмічені недоліки суттєво не знижують загальну оцінку дисертаційної роботи.

### **Загальний висновок щодо відповідності дисертації**

#### **встановленим вимогам**

Дисертаційна робота В. В. Маркевича «Мікроклональне розмноження видів рослин *in vitro* та їх постасептична адаптація», що подана на здобуття наукового



ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 06.01.05 - селекція і насінництво є самостійною і завершеною науковою працею.

В цілому враховуючи актуальність теми, глибину проведених досліджень, теоретичний рівень результатів і їх практичну цінність, вважаю, що дисертаційна робота відповідає вимогам пункту 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.08.2013 р. № 567., а її автор Маркевич Вячеслав Вікторович заслуговує присудження наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 06.01.05 - селекція і насінництво.

Офіційний опонент -

завідувач кафедри генетики, селекції  
рослин та біотехнології,  
доктор сільськогосподарських наук,  
професор



Л. О. Рябовол

