

## РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Титаренко Надії Володимирівни  
на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
«Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням мікроорганізмів»  
за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія

### Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами

Мікроклональне розмноження дозволяє в незалежності від пори року отримувати рослини з визначеним генотипом, вільні від бактеріальних та вірусних інфекцій. Одним з найважливіших технічних кроків у цьому процесі є поверхнева стерилізація фрагментів рослин, призначених для розмноження в асептичних умовах. Поживні середовища для культивування експлантів є також придатними для активного росту мікроорганізмів, тому за недостатньої стерилізації ініціальних експлантів бактерії та гриби, що залишилися, починають використовувати поживне середовище для власного росту, внаслідок чого воно стає непридатним, а рослина гине через ураження фітопатогенами або сапрофітами, що колонізують експлант. Ця проблема є знайомою для усіх, хто мав справу з мікроклональним розмноженням рослин. Протилежною ситуацією є надлишкова, більш жорстка, ніж потрібно, стерилізація, яка ушкоджує ініціальні експланти, внаслідок чого їх тканини руйнуються, рослина гине і продукти її розпаду дифундують у поживне середовище. Іншим проблемним кроком є адаптація при перенесенні рослин у ґрунт та природні умови навколишнього середовища. На цьому етапі може загинути велика кількість рослин. Відомо, що при невдалому доборі умов адаптації може загинути більше половини мікроклонів. Крім того, удосконалення та модифікації майже в усіх випадках потребує склад поживного середовища, тому що потреби рослин різних видів різняться між собою.

У дисертаційній роботі Титаренко Н.В. детально розглянуто способи покращення приживлюваності рослин на найбільш проблемних етапах мікроклонального розмноження. Саме тому актуальність роботи для біотехнології рослин не викликає сумнівів.

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідних робіт Наукового центру морської біології та біотехнології та кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: «Вивчення біологічної різноманітності, молекулярно-біологічних та біотехнологічних характеристик ендofітних бактерій та їх взаємодії з рослинами» (державний реєстраційний номер: 0117U001109), «Біологічна різноманітність актинобактерій Чорного моря, їх біотехнологічний потенціал та

пошук продуцентів нових антимікробних сполук» (державний реєстраційний номер: 0120102177), «Пошук продуцентів нових антимікробних сполук проти мультирезистентних патогенних мікроорганізмів серед мікробіоти Чорного моря» (державний реєстраційний номер: 01180000201).

### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність**

Достовірність та об'єктивність результатів дисертаційної роботи Н.В. Титаренко ґрунтується на достатньому об'ємі експериментальних досліджень на двох видах рослин: Павловнії повстяній та Ожині звичайній.

Автором логічно визначено мету, завдання та етапи роботи. Перший етап роботи присвячено удосконаленню процесу введення ініціальних експлантів ожини та павловнії в культуру *in vitro* для забезпечення ефективної приживлюваності експлантів на живильному середовищі. На даному етапі підбирали умови стерилізації фунгіцидами, оптимальні концентрації деяких компонентів поживного середовища, в тому числі - фітогормонів та желюючих агентів. На другому етапі, окремо від саме мікроклонального розмноження, проводили підбір штамів мікроорганізмів з найкращими фітостимулювальними та антагоністичними властивостями. На третьому етапі відібрані штами використовували для інокуляції коріння мікроклонів перед висадкою у ґрунт, тобто перед стадією адаптації.

Аналіз отриманих даних було проведено дисертантом за допомогою статистичних методів дисперсійного аналізу (ANOVA) та багатодіпазонного тесту Дункана (DMRT).

Отже, достовірність отриманих дисертантом результатів не викликає сумнівів, оскільки забезпечена достатньою кількістю експериментальних досліджень та використанням сучасних високоінформативних методів.

### **Наукова новизна положень, результатів та висновків дисертаційної роботи**

Дисертаційна робота Титаренко Н.В. має цінну наукову новизну. Уперше було здійснено підбір штамів-інокулянтів для процесів адаптації Ожини звичайної та Павловнії повстяної. При цьому уперше було показано, що мікроорганізми, виділені не тільки з рослинного середовища, але й з морської екосистеми, можуть стимулювати ріст рослин. Так, бактерії *Bacillus velezensis* ONU553, виділені з донних відкладень Чорного моря, виявилися активними стимуляторами росту дослідних рослин та були рекомендовані для адаптації мікроклонів Ожини звичайної. Даний результат може вказувати на убіквітарність виду *B. velezensis* та його пристосованість до різноманітних умов існування. Ймовірно, що даний мікроорганізм має у геномі кластери генів, які дозволяють йому активно колонізувати рослини та ставати частиною нормальної

мікробіоти рослин. Як зберігаються ці гени у глибоководних бацил - окреме наукове питання, яке само по собі може бути перспективним дослідженням. Цілкові імовірно, що штам *B. velezensis* ONU553 також може застосовуватися для покращення адаптації й інших видів рослин.

Уперше підібрано оптимальні фунгіциди та їх концентрації та фітогормональний склад поживного середовища для культивування експлантів ожини звичайної та павловнії повстяної.

Уперше досліджено залежність росту експлантів даних видів від концентрації агару у живильному середовищі.

Дисертантом уперше показано позитивний вплив аскорбінової кислоти у середовищі культивування на зниження оксидативного стресу і зменшення рівня некрозу експлантів Ожини звичайної та Павловнії повстяної.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Дисертаційна робота Титаренко Н.В. має велике практичне значення. Результати представлених досліджень можуть бути використані у мікроклональному розмноженні досліджених культур у виробничих лабораторіях агропромислових комплексів України та зарубіжних країн. Крім того, запропоновані удосконалені методики можуть бути застосовані для розмноження інших рослин. Дисертаційна робота містить детальну технологічну схему, яка, за потреби, дозволяє повністю відтворити технічний процес виробництва мікроклонів.

Досліджені у процесі роботи мікроорганізми можуть бути використані для виробництва біопрепаратів на їх основі. Так, на штам *Bacillus velezensis* ONU553 отримано патент на винахід 126710 МПК А01N63/22 «Штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю» та подано заявку на патент на винахід а202204268 «Штам *Streptomyces ambofaciens* ONU561 з антибіотичною та рістстимулювальною активностями».

Результати дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі при викладанні спеціальних курсів для біотехнологів на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології.

### **Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях**

Результати дисертаційного дослідження Титаренко Н.В. достатньою мірою оприлюднені на вітчизняних і зарубіжних наукових конференціях та опубліковані у фахових періодичних виданнях, в тому числі - у тих, що індексуються у міжнародних наукометричних базах даних.

Так, за темою дисертації присутні 14 наукових публікацій, з яких 2 статті у зарубіжних журналах, що входять до наукометричної бази Scopus, 3 статті у

фахових журналах категорії Б, 1 патент на винахід та 8 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій.

### **Загальна характеристика роботи**

Дисертаційна робота викладена на 211 сторінках машинописного тексту і оформлена відповідно до вимог до дисертаційних робіт. Складається зі вступу, огляду літератури за темою дисертації, опису матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних даних, розділу «Узагальнення результатів дослідження», висновків та списку цитованих літературних джерел, який складається із 271 найменування. Матеріали дисертації якісно ілюстровані.

У вступі обґрунтовано актуальність теми, визначено мету та завдання дослідження, об'єкт та предмет дослідження, сформульовано наукову новизну, розкрито теоретичне і практичне значення роботи. Викладено обсяг та структуру дисертації. В огляді літератури висвітлено сучасні уявлення щодо процесу мікроклонального розмноження та способів його удосконалення.

У дисертації використовуються біохімічні, мікробіологічні, статистичні методи, які відповідають меті і завданням дослідження.

Результати досліджень представлені у розділах 3-5, в яких поетапно наводяться дані експериментів з удосконалення мікроклонального розмноження на первинних етапах (підбір дезінфектантів і компонентів компонента середовища та їх оптимальних концентрацій), відбір мікроорганізмів з антагоністичними та фітостимулювальними властивостями (у модельному середовищі), застосування відібраних штамів на етапі адаптації мікроклонів ожини і павловнії (інокуляція експлантів).

Розділ 6 містить технологічні схеми мікроклонального розмноження дослідних рослин.

Розділ «Узагальнення результатів дослідження» дисертаційної роботи свідчить про глибоку обізнаність авторки у тематиці досліджень і вміння творчо аналізувати результати наукових досліджень. Дисертаційна робота Н.В. Титаренко написана фаховою мовою з використанням професійної лексики, стиль викладення матеріалу відповідає прийнятому у науковій літературі.

При описі окремих розділів автор дотримується логічного порядку. Представлення результатів досліджень є чітким та формально правильним з достатньою деталізацією та великою кількістю таблиць і рисунків. Однак, перегляд роботи викликав деякі **зауваження**:

1. У тексті зустрічаються зсуви рядків та абзаців, відсутності проміжків між розділами, зсув рисунків, пробіли між знаками пунктуації та словами.
2. Потрібно додати посилання на літературу: стор. 43 - перший абзац «Для культур *in vitro* обох вищезазначених рослин великою проблемою

- залишається ефективна адаптація мікроклонів, через що втрачається велика доля рослинного матеріалу та знижується економічна доцільність біотехнологічного процесу (посилання)». Стор. 49 - «...рослин (комерційна назва - BioNem AgroGreen), а препарат BioArc на основі *B.megaterium* використовується в якості фунгіцида (посилання)». Стор. 56 - потрібні посилання на останні два абзаци.
3. Стор. 43 - потрібно додати конкретні види рослин: «інокуляція мікроклонів ожини і павловнії корисними бактеріями на етапі адаптації до умов оточуючого середовища може підвищити приживлюваність саджанців у ґрунті та позитивно вплинути на зовнішні характеристики садивного матеріалу».
  4. Зустрічаються невдалі вирази: «Вихідним рослинним матеріалом для досліджень біотехнології мікроклонування Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) слугували рослини ожини сорту Торнфрі, що було зареєстровано у 1966 році американськими селекціонерами». З цього речення виходить, що матеріал для дисертаційного дослідження було зареєстровано у 1966 році американськими селекціонерами. Має бути: «рослини ожини сорту Торнфрі, зареєстровані у 1966 році американськими селекціонерами». Стор. 71: «Здатність дослідних бактерій до стимулювання росту рослин визначали на модельному об'єкті – крес-салаті *Lepidium sativum* L. (виробник – ТМ SeedEra, Україна». Має бути не виробник крес-салату, а виробник насіння.
  5. Стор. 84: «Також, фенолоподібні речовини, які все одно могли виділятися пошкодженими рослинними тканинами, не дивлячись на обробку антиоксидантами, *краще поглиналися та розподілялися углиб маси середовища*, не концентруючись безпосередньо біля експланта, як це відбувалось на твердому середовищі». Автором не вивчалися поглинання та розподіл фенолів, це лише одне з припущень автора, тому потрібно додати до цього речення «ймовірно».
  6. Загальноприйнятним у науковій літературі є введення відповідних пояснень під кожним рисунком, а не одноразово - у Матеріалах і методах.
  7. Є пропозиція зробити графіки кольоровими, оскільки вони невеликі за розміром, і їх візерунки не дуже сприймаються оком.
  8. Стор. 133 - рис. 5.2.5. і 5.2.6 або зробити одним рисунком, або помістити двома окремими рисунками один за одним для кращого сприйняття матеріалу.

9. Якщо в дисертації вказано, що за результатами досліджень було надано практичні рекомендації, слід оформити їх та прикласти до роботи у вигляді додатків.

### **Загальний висновок**

За своєю актуальністю, новизною, теоретичним та практичним значенням, об'ємом проведених досліджень та повнотою викладення в опублікованих працях робота повністю відповідає вимогам до дисертаційних робіт на присудження рівня PhD та може бути представлена до захисту, а її авторка, Титаренко Надія Володимирівна, заслуговує на присудження освітньо-кваліфікаційного рівня «Доктор філософії» за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».

### **Рецензент**

доцент біологічного факультету

Одеського національного університету

імені І. І. Мечникова, к.б.н.

*Н. 205*

Микола Галкін

**Підпис засвідчую.**

Проректор з науково-педагогічної роботи

Одеського національного університету

імені І. І. Мечникова

к.б.н., доцент



*[Handwritten signature]*

Олександр Запорожченко