

ВІДГУК

офіційного опонента, доктора сільськогосподарських наук, професора

Коломієць Юлії Василівни на дисертаційну роботу

Титаренко Надії Володимирівни

«Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням

мікроорганізмів»,

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії,

спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Актуальність обраної теми та зв'язок з науковими програмами

Дисертаційне дослідження присвячене удосконаленню біотехнології мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів на етапі постасептичної адаптації. Мікроклональне розмноження – швидкий та зручний метод репродукції рослин, що дозволяє отримувати велику кількість садивного матеріалу за короткий час. Розмножуючи рослини цим способом, можливо оздоровити саджанці від вірусних та бактеріальних інфекцій та, за потреби, налагодити цілорічне виробництво необхідного рослинного матеріалу. Мікроклони займають небагато місця, і тому не вимагають значної площі для вирощування, як звичайні рослини. Крім того, таким способом можна розмножувати представників тих видів та сортів, які мають труднощі з традиційними методами розмноження.

Головною ідеєю удосконалення біотехнології клонування рослин було здійснити штучну інокуляцію мікроклонованих рослин потенційно корисними мікроорганізмами на початку їх адаптації, що забезпечить формування постійної мікробіоти ризосфери рослин, підвищить їх

стійкість до враження фітопатогенами, приживлюваність мікроклонів та зовнішні характеристики.

Таким чином, метою роботи було удосконалити біотехнологію мікроклонального розмноження та постасептичної адаптації мікроклонів павловнії *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів.

Виконання дисертаційної роботи проводилося в межах держбюджетних науково-дослідних тем Біотехнологічного науково-навчального центру (БННЦ) та кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

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

Основні наукові положення, висновки дисертаційної роботи Н. В. Титаренко є результатом наукового аналізу та статистичної обробки отриманих даних. План досліджень є логічним, застосовані методи є сучасними й інформативними. Висновки обґрунтовані, відповідають поставленій меті, завданням роботи та витікають із результатів проведених досліджень.

Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи

Наукова новизна дисертаційної роботи Н. В. Титаренко не викликає сумнівів. Теоретично обґрунтовано та відпрацьовано удосконалені процеси мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі з використанням мікроорганізмів на стадії постасептичної адаптації рослин та протоколи біотехнологічного процесу мікроклонування цих рослин. Вперше встановлено, що бактерії *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch і *S. albidoflavus* Conc32 є ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів

павловнії, а *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. globisporus* Lim4, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch – для адаптації ожини.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що отримані дані дозволяють запропонувати використання рїстстимуловальних мікроорганїзмів для розробки ефективних біотехнологїй процесу клонування рослин павловнії та ожини. Рекомендовано використовувати в біотехнологїї клонування рослин павловнії під час постасептичної адаптації бактерії штаму *B. megaterium* ONU500, а для ожини – бактерії штаму *B. velezensis* ONU553. Бактерії, що показали позитивний вплив на постасептичну адаптацію мікроклонів, будуть слугувати основою для подальшого створення консорціуму рїстстимуловальних та захисних мікроорганїзмів, та будуть використані для розробки біопрепаратів, що направлені на успішне подолання адаптаційного стресу при переході рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro*.

Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях

За результатами дисертаційного дослідження автором опубліковано 14 наукових публікацій, з яких 2 статті у зарубїжних журналах, що входить 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

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка містить 5 розділів, узагальнення, висновків та списку цитованої літератури, що містить 272 найменування, з них 251 англomовне.

Структура вступу повністю відповідає загальноприйнятим вимогам. У ньому обґрунтовано актуальність і важливість теми дисертації, вказано зв'язок роботи з держбюджетною темою, висвітлено мету, завдання та методи дослідження, зроблено акцент на науковій новизні одержаних результатів та їх практичній спрямованості, охарактеризовано особистий внесок здобувача та рівень апробації і публікування результатів дослідження.

У розділі 1 «Огляд літератури» наведено матеріали огляду наукової літератури з питань за основними напрямками досліджень автора. Зокрема, проаналізовано особливості розмноження павловнії та ожини в культурі *in vitro* та використання мікроорганізмів у біотехнології рослин. Завершується розділ висвітленням перспектив застосування бактерій *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Actinobacteria* spp. для удосконалення біотехнології мікроклонування рослин.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» головний наголос зроблено на програмно-методичних питаннях. Спочатку описано загальну схему дослідження та об'єкти дисертаційного дослідження, якими були рослини ожини сорту Торнфрі, зареєстровані у 1966 році американськими селекціонерами, придбані у ТОВ «Ваш Сад» та рослини Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.), що ростуть в умовах відкритого ґрунту на території Ботанічного саду ОНУ ім. І.І. Мечникова. Потім здобувач переходить до опису методичних інструментів, які були застосовані ним.

Третій розділ «Удосконалення мікроклонального розмноження павловнії та ожини на первинних етапах» присвячено результатам використання фунгіцидних препаратів на етапі введення ініціальних експлантів, аскорбінової кислоти під час введення експлантів павловнії та ожини в культуру *in vitro*, впливу консистенції живильного середовища на розвиток експлантів дослідних рослин під час введення в культуру *in vitro*,

застосування альтернативних желюючих компонентів на етапі введення павловнії та ожини в культуру *in vitro*, оптимізації фітогормонального складу живильного середовища на етапі стерильного живцювання дослідних рослин. Автором встановлено, що використання дослідних фунгіцидних препаратів як додаткового етапу стерилізації експлантів павловнії дозволило суттєво зменшити рівень видимої грибової контамінації та підвищити приживлюваність під час введення в культуру *in vitro*. Зокрема, на основі проведених досліджень виявлено, що під час введення в культуру *in vitro* рослин Павловнії повстяної та Ожини звичайної для покращення приживлюваності, індукції множинної проліферації та пришвидшення проліферації бруньок доцільно додавати до середовища МС аскорбінову кислоту в концентраціях 50,0 мг/л для павловнії та 100,0 мг/л для ожини. При дослідженні впливу консистенції живильного середовища виявлено, що застосування середовищ зі зниженою концентрацією желюючого агенту демонструє перевагу використання напіврідкого живильного середовища МС із 0,4% агару для початкових етапів мікроклонального розмноження павловнії та ожини.

Четвертий розділ «Відбір антагоністичних бактерій з рістстимулювальними властивостями» присвячено визначенню антагоністичних властивостей дослідних бактерій до міцеліальних грибів, впливу дослідних бактерій на ріст модельних рослин крес-салату. Аналіз результатів досліджень переконливо доводить антагоністичну активність досліджуваних бактерій *E. italicus* ONU547, *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. pumilus* ONU554 та 23 ізолятів актинобактерій до міцеліальних грибів: *A. niger*, *F. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *R. cerealis*, *P. variotii* та *P. expansum*. Автор зазначає, що бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. pumilus* ONU554, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547 та дослідні ізоляти актинобактерій показали позитивний вплив на проростання

насіння та ріст рослин *in vitro* на прикладі модельної рослини *Lepidium sativum* L., що забезпечувало підвищення частки пророслого насіння, збільшення довжини коренів, пагонів, і кількості коренів у проростків у порівнянні з контролем.

У п'ятому розділі «Адаптація мікроклонованих рослин до умов *ex vitro* з використанням мікроорганізмів» подано результати дослідження адаптації мікроклонів павловнії та ожини з бактеріями *E. italicus* ONU547, бактеріями роду *Bacillus*, ізолятами актинобактерій, порівняльний аналіз та визначення найефективніших дослідних бактерій для покращення адаптації мікроклонованих рослин. Відібрано 10 перспективних штамів та ізолятів бактерій, що виявили позитивний вплив на приживлюваність, середню висоту, кількість вузлів та площу листа рослин павловнії та ожини. Показано, що найбільшу ефективність для постасептичної адаптації мікроклонів павловнії показали бактерії *B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch, *S. albidoflavus* Conc32. Для адаптації ожини – *B. velezensis* ONU553, *S. globisporus* Lim4, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *E. italicus* ONU547, *S. albidoflavus* Conc32, *S. ambofaciens* Myt7ch. Ці бактерії можуть слугувати основою для подальшого створення консорціуму рістстимулювальних та захисних мікроорганізмів та розробки біопрепаратів, спрямованих на успішне подолання адаптаційного стресу при переході рослин з умов *in vitro* в умови *ex vitro*.

Дисертація завершується рекомендаціями по практичному застосуванню результатів досліджень, узагальненням та висновками, які кореспондуються із матеріалами і положеннями, викладеними в окремих розділах дисертації.

Дискусійні положення та зауваження до роботи:

1. Формулювання наукової новизни переважно є переліком того, що робилося, а не того, що встановлено і його практичне значення.

2. В обґрунтуванні вибору теми дослідження є посилання на вчених які займалися даною тематикою, в дисертації жодної згадки.

3. Розділ огляд літератури має закінчуватись формулюванням ідеї роботи або робочої гіпотези.

4. Обґрунтуйте вибір фунгіцидних речовин ципродинілу та дифенокназолу (препаратів Хорус і Скор, відповідно) для поверхневого знезараження ініціальних експлантів як додаткового етапу стерилізації рослинного матеріалу.

5. Як проводили відбір ауксинів та цитокінінів для досліджень. Чим керувались при цьому, оскільки в роботі зазначено про велику різноманітність наукових даних про видову специфічність особливостей вирощування досліджуваних рослин.

6. Автором вперше встановлено, що бактерії *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch і *S. albidoflavus* Copc32 є ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів павловнії та ожини. Залишається незрозумілим, чому нові, отримані вперше результати захищені лише патентом, що стосується штам *Bacillus velezensis* ONU553 - продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з рістстимулювальною активністю. Хотілось би, щоб був запатентований сам підхід до мікроклонального розмноження павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. та ожини *Rubus fruticosus* L. сорту Торнфрі, оптимізації якого і присвячена дисертаційна робота.

7. Як Ви можете пояснити з позицій фізіології рослин найкращі результати приживлюваності, проліферації бруньок, кількості сформованих пагонів та вузлів у рослин *in vitro* за додавання у середовище кукурудзяного крохмалю в концентрації 7%?

8. Чим, з точки зору біології, на думку дисертантки, можна пояснити високоефективний позитивний вплив бактерій роду *Bacillus* на

середню площу листа мікроклонів ожини та павловнії на 14-ту та 30-ту доби спостережень.

Однак, наведені зауваження не зменшують наукової і практичної цінності дисертації. Вона в цілому є закінченою науковою працею, що відзначається науковою новизною і безперечно має практичне значення.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Титаренко Надії Володимирівни «Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням мікроорганізмів» є завершеним науковим дослідженням з актуального напрямку біотехнологій *in vitro*. Робота містить оригінальні результати, що мають теоретичне й прикладне значення. Дослідження створює можливість для застосування удосконаленої біотехнологічної схеми отримання садивного матеріалу павловнії та ожини шляхом мікроклонального розмноження з використанням мікроорганізмів на етапі постасептичної адаптації мікроклонів. За своєю актуальністю, новизною отриманих результатів, обсягом виконаних досліджень, а також повнотою їхнього висвітлення в опублікованих працях дисертаційна робота Н. В. Титаренко повністю відповідає всім вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора філософії, а її авторка Надія Володимирівна Титаренко заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Офіційний опонент

професор, декан факультету захисту рослин,
біотехнологій та екології

Національного університету біоресурсів і
природокористування України,

доктор сільськогосподарських наук
Навчальний заклад кадрів



С. ГРИЩЕНКО

Ю.В. Коломієць