

## ВІДГУК

офіційного опонента, доктора сільськогосподарських наук, старшого наукового співробітника Зеленянської Наталі Миколаївни 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.

У національних програмах провідних країн світу біотехнологія є однією з пріоритетних галузей, яка вирішує проблеми, пов'язані з нестачею продовольчої сировини, збереженням біологічного різноманіття, попередження забруднення навколишнього середовища, діагностикою і лікуванням небезпечних захворювань та ін. Одним із напрямів біотехнології є мікроклональне розмноження рослин, яке сьогодні широко використовують у біотехнологічній науці та сільськогосподарській практиці. Незважаючи на те, що загальні стандартні методи та підходи до біотехнології мікроклонування рослин вже існують, для різних видів рослин окремі технологічні етапи все ж таки потребують суттєвого удосконалення чи коригування. Для модельних рослин, які автор дисертаційного дослідження використовувала у роботі – Ожина звичайна (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнія повстяна (*Paulownia tomentosa* Steud.) актуальним є створення ефективних протоколів проведення поверхневої стерилізації ініціальних експлантів, одержання необхідної кількості життєздатних мікроклонів на етапах стерильного живцювання, укорінення (у т. ч. шляхом зниження рівня оксидативного стресу експлантів, модифікації складу живильного середовища) і, особливо, на етапі переведення мікроклональних рослин з умов *in vitro* до умов *in vivo*. Підвищити їх адаптаційний потенціал на вказаному етапі можливо за рахунок формування власної мікробіоти. Тому питання удосконалення біотехнології клонування рослин Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.), у т. ч. шляхом здійснення їх штучної інокуляції потенційно корисними мікроорганізмами на початку адаптації є актуальним та своєчасним.

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: «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 і рекомендацій, сформульованих у дисертації, та їх достовірність.**

Автором дисертаційної роботи всебічно проведено аналіз результатів наукових праць вітчизняних і зарубіжних авторів з питань розмноження Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) в культурі *in vitro*, використання мікроорганізмів у біотехнологіях рослин, зокрема перспектив застосування бактерій родів *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. та *Actinobacteria* spp. На підставі проведеного аналізу визначено дискусійні положення, недостатньо вивчені та не вивчені раніше питання, які й потребували подальших досліджень. Як результат, автором дисертації чітко окреслені мета та завдання дослідження.

У роботі використано сучасні методи досліджень: біотехнологічні (мікроклональне розмноження рослин), мікробіологічні (визначення антагоністичної активності бактерій, бактеріальна інокуляція рослин), агробіологічні (визначення показників росту та розвитку рослин), організаційні (порівняльний аналіз), статистичні (дисперсійний аналіз).

Достовірність отриманих експериментальних результатів не викликає сумніву, оскільки вони достатньо науково і статистично обґрунтовані. Кожен підрозділ дисертаційного дослідження завершується коротким теоретичним обґрунтуванням, поясненням отриманих експериментальних результатів та їх порівнянням із даними інших авторів, аналогічного напрямку дослідження. Наведений цифровий матеріал (у т. ч. у таблицях та графіках) представлено з середньою похибкою досліду та довірчим інтервалом.

Достовірність та обґрунтованість основних наукових положень висновків і рекомендацій дисертаційної роботи підтверджується також її апробацією на міжнародних науково-практичних конференціях, конференціях професорсько-викладацького складу та наукових працівників ОНУ ім. І.І. Мечникова, публікаціями у зарубіжних та вітчизняних виданнях. Висновки цілком відображують суть проведених досліджень та відповідають поставленим завданням.

**Наукова новизна положень, результатів і висновків дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота Надії Володимирівни Титаренко має беззаперечну наукову новизну. Вперше для поверхневого знезараження ініціальних експлантів Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) встановлено високу дієвість фунгіцидних речовин ципродинілу та дифенконазолу (препарати Хорус і Скор).

Показано позитивний вплив аскорбінової кислоти у середовищі культивування для зниження оксидативного стресу і зменшення рівня некрозу експлантів та залежність їх росту від концентрації агару, вмісту фітогормонів у живильному середовищі.

Показано, що антагоністично активні бактерії *Enterococcus italicus* ONU547, *Bacillus megaterium* ONU500, *Bacillus velezensis* ONU553, *Bacillus*

*pumilus* ONU554, *Bacillus subtilis* ONU559, *Streptomyces albidoflavus* Conc11, *Streptomyces pactum* Conc4, *Streptomyces globisporus* Lim4, *Streptomyces albidoflavus* Conc32, *Streptomyces ambofaciens* Myt7ch проявляють і рістстимулюючу активність у рослин крес-салату *in vitro*.

Вперше встановлено, що бактерії *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500, *B. subtilis* ONU559, *S. ambofaciens* Myt7ch і *S. albidoflavus* Conc32, *E. italicus* ONU547, *S. globisporus* Lim4 є ефективними для успішної постасептичної адаптації мікроклонів модельних рослин. Наукова новизна цих досліджень підтверджена патентом на винахід 126710 МПК А01N63/22 «Штам *Bacillus velezensis* ONU553 – продуцент ліпопептидних антибіотиків, антагоніст *Staphylococcus aureus* та ентеробактерій з ростостимулювальною активністю».

**Практичне значення отриманих результатів** полягає у створенні розширених технологічних схем отримання садивного матеріалу Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павлонії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) шляхом мікроклонального розмноження, що дозволить отримувати комерційні кількості садивного матеріалу з використанням невеликих виробничих площ.

Результати роботи використовуються у навчальному процесі при викладанні курсів «Біотехнологія рослин», «Загальна біотехнологія», «Мікробіологія» та спеціальному практикумі на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

**Повнота викладу основних результатів у наукових фахових виданнях.** Основні результати досліджень опубліковані в 14 наукових працях, 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 включає анотацію українською та англійською мовами, вступ, огляд літератури, експериментальну частину, яка містить 6 розділів, узагальнення результатів дослідження, висновки та список використаних джерел (272 найменування, з них 251 англomовне). Матеріали роботи викладено на 211 сторінках машинописного тексту.

У **вступі** висвітлено всі елементи загальної характеристики дисертації. Обґрунтовано напрям наукових досліджень, показано їх зв'язок з науковими програмами, планами, темами, охарактеризовано методи досліджень, обґрунтовано наукову новизну і практичну значимість одержаних результатів, зазначено особистий внесок здобувача, наведено результати апробації та впровадження досліджень.

**Перший розділ** присвячено огляду наукової літератури за темою дисертації. На основі проведеного аналізу показано, що розмноження рослин *in vitro* має не тільки ряд переваг перед традиційними технологіями, але супроводжується і певними проблемами, пов'язаними з широким спектром можливих причин: біологічних, фізіологічних, генетичних або технічних. Останні можуть проявлятися на різних етапах технології. Тому

автор роботи вказує на необхідність їх удосконалення і акцентує увагу на пошуку ефективних фунгіцидних препаратів, модифікації складу та консистенції поживних середовищ, зниженні оксидативного стресу, підвищенні адаптивного потенціалу рослин при зміні умов *in vitro* на *ex vitro*. Для багатьох культур останній можливо збільшити за рахунок використання різних груп мікроорганізмів. Вирішення цих питань є актуальним і при мікроклонуванні Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.).

У **другому розділі** представлено загальну схему дисертаційного дослідження, яка включає: варіанти модифікацій живильних середовищ для різних етапів культивування, умови, фізичні параметри культивування *in vitro*, методики визначення антагоністичних властивостей дослідних бактерій до міцеліальних грибів, дослідження впливу бактерій на ріст модельних рослин крес-салату *in vitro*, проведення адаптації мікроклональних рослин Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) до умов *ex vitro* з використанням мікроорганізмів. Наведено характеристику дослідних (донорних) рослин, штамів та ізолятів мікроорганізмів, використаних у роботі.

У **третьому розділі** наведені результати експериментальних досліджень з удосконалення мікроклонального розмноження Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) на первинних етапах. На етапі стерилізації експлантів показано високу ефективність фунгіцидів Хорус і Скор; на етапах введення експлантів у культуру *in vitro*, стерильного живцювання та укорінення – встановлено позитивний вплив модифікованого за вмістом фітогормонів (у тому числі і додавання антиоксиданту) консистенцією та альтернативними желюючими агентами живильного середовища.

У **четвертому розділі** здобувачем представлені результати досліджень щодо відбору антагоністичних бактерій з рістстимулюючими властивостями та антагоністична активність ізолятів актинобактерій. Автор показала, що найбільші зони затримки росту та антагонізм до всіх дослідних штамів грибів були у бактерій *B. velezensis* ONU553, *B. megaterium* ONU500 та *B. pumilus* ONU554. З ізолятів найкращими антагоністами (до: *A. niger*, *F. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *R. cerealis*, *P. variotii* та *P. expansum*.) були ізоляти Conc32, Conc10, Myt7ch, Conc4 та Lim4. *Enterococcus italicus* ONU547 ( $10^7$  КУО/мл), бактерії роду *Bacillus* (*B. megaterium* ONU500, *B. velezensis* ONU553 та *B. subtilis* ONU559 ( $10^8$  КУО/мл) проявляли й рістстимулюючі властивості *in vitro* на рослинах крес-салату.

У **п'ятому розділі** аналізуються результати досліджень адаптації мікроклонованих рослин Ожини звичайної (*Rubus fruticosus* L.) та Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa* Steud.) до умов *ex vitro* з використанням мікроорганізмів. Згідно з отриманими результатами та на основі визначення критерію ефективності автор довів, що найефективнішим штамом для моноінокуляції мікроклонів ожини є *B. velezensis* ONU553, павловнії – *B. megaterium* ONU500.

У шостому розділі автор представив удосконалені розширені технологічні схеми отримання садивного матеріалу ожини (*Rubus fruticosus* L.) та павловнії (*Paulownia tomentosa* Steud.) шляхом мікроклонального розмноження і навів розрахунки кількості, строків отримання адаптованого садивного матеріалу від одного ініціального експланту.

**Висновки** впливають із завдань, які було поставлено перед дисертантом. Вони всебічно обґрунтовані експериментальними даними, повною мірою висвітлюють підсумкові результати досліджень.

**Окремі дискусійні питання та зауваження.** За детального аналізу дисертації здобувача доцільно відмітити високий рівень підготовки, володіння методикою написання та дослідної справи, проте в процесі рецензування і аналізу матеріалів дисертації виникли окремі зауваження, питання, які потребують уточнення, зокрема:

1. У дисертаційній роботі вказано, що результати використовуються у навчальному процесі при викладанні курсів «Біотехнологія рослин», «Загальна біотехнологія», «Мікробіологія» та спеціальному практикумі на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Проте автором не наведено документального підтвердження цьому (для прикладу це може бути Протокол рішення кафедри щодо включення цих матеріалів у вищенаведені курси, Протокол рішення кафедри щодо видання практичних, методичних рекомендацій, які доповнюють НМК вказаних дисциплін та ін.).
2. При визначені наукової новизни доцільно було б розподілити елементи за категоріями «вперше», «удосконалено», «дістало подальшого розвитку».
3. Автором неодноразово вказується на економічний ефект застосування нових матеріалів, їх перевагу над базовими (стор. 96), економію енергетичних ресурсів (стор. 83-84), загалом економічність технології (стор. 19). Проте робота не містить розрахунків щодо економічної ефективності удосконалених технологічних схем отримання садивного матеріалу ожини *Rubus fruticosus* L. та павловнії *Paulownia tomentosa* Steud. шляхом мікроклонального розмноження. Така інформація є надзвичайно важливою і актуальною для виробників садивного матеріалу *in vitro*.
4. У кінці дисертаційної роботи автор наводить тільки загальні висновки, проте експериментальний матеріал краще б сприймався, якщо кожен розділ роботи узагальнювався висновками та переліком друкованих праць автора за даним розділом.
5. На рисунках 4.2.10; 5.1.5; 5.1.6; 5.2.5; 5.2.6 наводиться фото мікроклональних рослин з метою порівняння певних біометричних параметрів у контрольних варіантах та після удосконалених прийомів. Але на даних рисунках відсутня лінійка (чи інший маркер), що погіршує сприйняття різниці за вказаними параметрами.

Висловлені зауваження та поставлені питання не впливають на загальну оцінку якості дисертаційної роботи та її результатів; вони не стосуються концепції дослідження і мають дискусійний характер.

Дисертаційна робота Титаренко Надії Володимирівни написана українською мовою з використанням професійної лексики, стиль викладення матеріалу відповідає прийнятому в науковій літературі.

### ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Титаренко Надії Володимирівни «Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням мікроорганізмів» виконана на високому науковому та методичному рівні, є завершеною науковою працею, у якій отримані нові наукові результати, що мають теоретичну і практичну цінність та загалом вирішують питання розробки ефективних біотехнологій мікроклонального розмноження цінних сільськогосподарських культур з використанням мікроорганізмів. За даними експериментальних досліджень, змістом, аргументованістю висновків, повнотою викладення матеріалу в друкованих виданнях дисертаційна робота Титаренко Надії Володимирівни «Удосконалення біотехнології мікроклонального розмноження *Rubus fruticosus* L. і *Paulownia tomentosa* Steud. з використанням мікроорганізмів» повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року № 44, а її автор Титаренко Надія Володимирівна заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія».

Офіційний опонент

Старший науковий співробітник,

заступник директора з науково-інноваційної

діяльності Національного наукового центру

«Інститут виноградарства і виноробства

імені В.Є. Таїрова» Національної академії

аграрних наук України,

доктор сільськогосподарських наук

  
Н. М. Зеленьанська

Підпис Н. М. Зеленьанської засвідчую:

Провідний фахівець з кадрів

ННЦ «ІВіВ ім. В. Є. Таїрова»

  
Н. В. Мазур