

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Пушкарьової Надії Олександрівни**

**«Розробка способів мікроклонального розмноження та вивчення впливу культивування *in vitro* на біохімічні властивості та генетичну мінливість рослин рідкісних видів роду *Crambe*»,**

поданої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Дисертаційна робота Н.О. Пушкарьової присвячена розробці методів введення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження п'яти видів рослин роду *Crambe*, а саме *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana* та *C. maritima* з метою їх збереження в природі як потенційно цінних видів рослин для потреб сільського господарства, харчової та хімічної промисловості, біоенергетики, тощо. Дане дослідження є актуальним, оскільки спрямоване на збереження біорізноманіття рослинного світу.

Дисертаційна робота Пушкарьової Н.О. виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України у рамках бюджетних тем, а також за підтримки об'єкту національного наукового надбання України «Колекція зародкової плазми рослин флори України та світової флори».

Дисертація є добре спланованою, її мета і завдання сформульовані автором достатньо чітко і конкретно. Виклад матеріалу відповідає поставленій меті та завданням дисертаційної роботи. Наукові положення дисертації витікають з аналізу значної і цілком достатньої кількості експериментальних досліджень, проведених за використання сучасних біотехнологічних методів. Результати досліджень достатньо повно висвітлені в публікаціях автора. В цілому по темі дисертації опубліковано 14 робіт: 7 статей у фахових наукових журналах та 7 тез доповідей у матеріалах з'їздів і конференцій. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним планом. Структурно робота складається із анотації української та англійською мовами, списку опублікованих праць за темою дисертації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, та трьох розділів: «Огляду літератури», розділу «Матеріали та методи досліджень», розділу «Результати досліджень та їх обговорення», розділу, присвяченому узагальненню результатів досліджень, а також висновків, списку використаних джерел, що включає 185 робіт та додатків. Дисертаційна робота викладена на 155 сторінках друкованого тексту і містить 21 таблицю та 44 рисунків.

У вступі дано коротке обґрунтування актуальності проблеми, вирішенню якої присвячена дисертаційна робота, зв'язок роботи з науковими програмами, планами та темами, вказано мету, завдання дослідження, наукову новизну, практичну цінність роботи, основний внесок здобувача, основні положення, які виносяться на захист, та результати апробації роботи.

В «Огляді літератури» автором стисло наведено інформацію щодо проблеми скорочення видового різноманіття рослинного світу, розглянуто роль методів біотехнології у збереженні біорізноманіття рослин, вказано основні прийоми та підходи, що застосовують при роботі зі зникаючими видами. Крім того, в огляді наведено ботанічний опис рослин роду *Crambe* L., зокрема досліджуваних рідкісних видів: *C. koktebelica*, *C. tataria*, *C. aspera*, *C. steveniana*, та *C. maritima*, показано потенційні шляхи їх прикладного застосування та описано дослідження по введенню деяких з них в культуру *in vitro*. Також стисло наведено дані щодо впливу асептичних умов культивування на ряд біохімічних характеристик та генетичну стабільність рослин, що вирощують та зберігають в умовах *in vitro*.

У Розділі «Матеріали і методи досліджень» представлено відомості про використання здобувачем різноманітних біотехнологічних методів, а саме методів культури *in vitro* (введення рослин досліджуваних видів у культуру *in*

*vitro* та дослідження умов їх мікроклонального розмноження); біохімічних методів (визначення антиоксидантної активності, вмісту загального розчинного білка, вмісту поліфруктанів та жирних кислот). У роботі автор також користувалася методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для визначення генетичних змін внаслідок культивування та розмноження рослин досліджуваних видів в культурі *in vitro* за використання ISSR- та SSR-маркерів та методом статистичної обробки одержаних даних. У підсумку, використані у роботі методи свідчать про достатньо високий рівень володіння дисертантом сучасними методами досліджень у галузі біотехнології рослин.

Розділ «Результати досліджень та їх обговорення» складається з 5 підрозділів, де автор послідовно викладає власні результати роботи і достатньо аналітично їх обговорює, посилаючись на відповідні джерела. Зокрема, наводить дані щодо способів стерилізації насіння досліджуваних рослин та особливостей їх пророщування в культурі *in vitro*. Наводить дані щодо підбору умов для регенерації пагонів з різних типів експлантів: пазушних бруньок, листових, корневих та черешкових експлантів, оцінюючи їх морфогенетичний потенціал, а також способи укорінення. У результаті проведених досліджень автором встановлено, що з корневих експлантів більш активно утворюється калюс, із листових – корені, а із черешкових – пагони.

Також дисертантка провела дослідження щодо можливого впливу асептичних умов культивування та мікроклонального розмноження на біохімічні характеристики п'яти видів рослин *Crambe*, використаних в роботі. Зокрема, нею було визначено вміст загального розчинного білка, поліфруктанів, жирних кислот та антиоксидантну активність у вегетативних органах цих рослин. У результаті було встановлено, що для більшості рослин (*C.koktebelica*, *C. steveniana*, *C. maritima*), що культивували *in vitro*, відмічено збільшення вмісту загального розчинного білка у порівнянні з рослинами, що росли в умовах *in vivo*. Для двох видів (*C. steveniana*, *C. maritima*) не було

встановлено суттєвих відмінностей за вмістом поліфруктанів у вегетативних органах рослин залежно від умов культивування. З іншого боку, для рослин *C. koktebelica* та *C. aspera* відмічали значне підвищення вмісту поліфруктанів у рослинах, що культивували *in vivo*, а для *C. tataria*, навпаки, вміст поліфруктанів був вищим у асептичних рослин. Антиоксидантна активність залишалась сталою незалежно від умов культивування.

У вегетативних органах рослин *C. tataria*, *C. steveniana* та *C. maritima*, що культивували *in vitro*, було відмічено значне підвищення загального вмісту жирних кислот, для інших видів суттєвої різниці не виявлено. При цьому було показано збільшення вмісту жирних кислот з більшим ступенем ненасиченості (C16:1, C18:2, C18:3) та зміни якісного складу жирних кислот у деяких видів, що культивували в умовах відкритого ґрунту. За результатами молекулярно-генетичного аналізу автором показано відсутність генетичних змін у досліджуваних видів рослин, що культивували в умовах *in vitro*, окрім *C. steveniana*.

З отриманих результатів видно, що автором проведено дуже великий та кропіткий об'єм експериментальної роботи та застосовано значну кількість сучасних біотехнологічних методів досліджень. Висновки, наведені автором, є достатньо обґрунтованими, вони логічно впливають з експериментальних даних, які отримано дисертантом і повністю відображають їх зміст, окрім першого висновку, який є більш узагальнюючим.

Підводячи загальний підсумок роботи Н.О. Пушкарьової, слід зазначити, що дисертація є логічно завершеним дослідженням, виконаним на сучасному методичному рівні, і має наукову та практичну цінність. Автор характеризується аналітичним складом мислення, вміє критично викласти та коректно інтерпретувати результати власних досліджень. Дисертація написана доброю мовою, акуратно оформлена (зокрема, гарно ілюстрована), отримані результати достовірні та статистично оброблені.

У той же час хотілось би висловити деякі зауваження та побажання щодо оформлення результатів досліджень. Зокрема, в тексті дисертації в «Переліку умовних скорочень» незрозуміло навіщо наведено скорочення для таких словосполучень, як «національний природничий парк», «природничий заповідник», «регіональний ландшафтний парк» чи «біосферний заповідник»? Також в переліку автор двічі дублює (стор. 20) скорочення для деяких словосполучень, як наприклад, «антиоксидантна активність, жирні кислоти» та інш.

У «Вступі» дисертації та авторефераті не дуже вдало сформульовано об'єкт дослідження, зокрема його сформульовано дуже широко і загально. В тексті дисертації багато орфографічних та граматичних помилок, описок, невдалих виразів. Так, не можна називати «промисловий розчин «Білізна» одним із типів стерилізуючи сполук (розділ «Матеріали і методи досліджень»). Стерилізуючою сполукою в «Білізні» (хто виробник цього продукту також здобувачем не вказано), як правило, є гіпохлорит натрію, концентрацію якого необхідно було вирахувати і надати в тексті дисертації.

Серед невдалих виразів ще є таке: «Кожен експеримент проведено двічі у трьох повторах» (стор. 60). Не варто також експланти називати «частинами кореня, листка чи черешка», краще писати «сегменти чи фрагменти кореня, листка чи черешка» *X-денних* (слід було б вказати якого вони віку) проростків чи рослин. Замість «інтенсивність *наростання* калюсної тканини» краще писати «інтенсивність *росту* калюсної тканини...», невдало звучить «немає *видимої* калюсної тканини», краще «відсутність утворення калюсу» (стор. 84, 89, 94, 99), замість «мікроклонування рослин» варто писати «мікроклональне розмноження рослин».

На моє глибоке переконання при вивченні складу жирних кислот у 5 досліджуваних видів рослин *Crambe* необхідно було б визначити чи змінюється у результаті культивування рослин *in vitro* перш за все вміст

ерукової кислоти, яка є надзвичайно шкідливою для здоров'я людини, і у дуже великій кількості міститься у представників родини *Crambe*.

Однак ці незначні недоліки не знижують загального враження про роботу і дисертація в цілому є актуальним, цікавим та закінченим дослідженням, повністю відповідає вимогам МОН України щодо кандидатських дисертацій, а її автор Пушкарьова Надія Олександрівна безумовно заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Завідувач відділу клітинної біології  
та біотехнології

ДУ «Інституту харчової біотехнології та  
геноміки НАН України»,

член-кореспондент НАН України,

доктор біологічних наук, професор

Ємець А.І.

Підпис член-кореспондента НАН України Ємець А.І. засвідчую:

Вчений секретар Інституту,  
к.б.н., с.н.с.



Пірко Я.В