

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Загричук Оксани Михайлівни

«Отримання культури *in vitro* *Deschampsia antarctica* DESV. та її фізіолого-генетичне вивчення», що подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія

Дисертаційна робота Загричук Оксани Михайлівни «Отримання культури *in vitro* *Deschampsia antarctica* DESV. та її фізіолого-генетичне вивчення» була виконана у лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка у співпраці з відділом генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України у рамках проекту Національного антарктичного наукового центру, Держкомінформнауки №Н12/2012 «Розробка системи біоіндикації кліматичних змін в Прибережній Антарктиці за параметрами динаміки наземних рослинних ценозів» та наукової бюджетної теми ІМБІГ НАНУ «Мінливість геному рослин в екстремальних умовах зростання» (№ держреєстрації 0115U003743).

Тема дисертаційної роботи є актуальною, оскільки стосується недосліджених аспектів культивування антарктичних рослин *Deschampsia antarctica*. Щучник антарктичний є одним з двох видів судинних рослин, що ростуть на антарктичному материка та прилеглих до нього островах. Ці рослини пристосувалися до екстремальних умов середовища, і, таким чином, становлять інтерес для дослідників, оскільки здатні не тільки виживати у екстремальних умовах, але й синтезувати біологічно активні сполуки. Зокрема, рослини *D. antarctica* є природним джерелом антиоксидантів, що можуть використовуватися у фармацевтичній промисловості. Також встановлено здатність вторинних метаболітів *D. antarctica*, зокрема сполук фенольної природи, інгібувати проліферацію клітин меланоми.

Новизна дисертаційної роботи полягає у тому, що досі не проводилися дослідження щодо можливості уведення рослин *D. antarctica* в культуру *in vitro* шляхом використання насіння, не проводили дослідження щодо збереження генетичних характеристик у клонального потомства *D. antarctica* в процесі

тривалого культивування *in vitro*, не визначали діапазон стійкості цих рослин до токсичних металів.

Дисертація Загречук О. М. викладена на 171 сторінці друкованого тексту та складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, трьох експериментальних розділів, аналізу і узагальнення результатів дослідження, висновків та списку літератури. Результати досліджень, викладених у дисертації, ілюстровано і підтверджено 27 рисунками та 7 таблицями. Перелік цитованої літератури містить 291 найменування, у т.ч. 188 латиницею.

У «Переліку умовних позначень, скорочень і термінів» наведено основні скорочення понять та назв, які зустрічаються у тексті.

У розділі «Огляд літератури» автором подано інформацію про ареал рослин *D. antarctica*; їх анатомо-морфологічні та ботанічні особливості; кліматичні умови Антарктики; наведено аналіз даних щодо стійкості рослин до температурного і світлового стресу, а також ультрафіолетового випромінювання; проаналізовано наявні цито- та молекулярно-генетичні дослідження рослин *D. antarctica*, а також роботи з культивування рослин цього виду в умовах *in vitro*.

Розділ «Матеріали і методи досліджень» містить відомості щодо основних методів, які було використано при виконанні роботи, а саме отримання асептичних рослин, підбір умов для вегетативного розмноження, вивчення особливостей росту рослин на живильному середовищі з токсичним компонентом, молекулярно-біологічні та цитогенетичні дослідження.

У розділі «Результати досліджень та їх обговорення» подано отримані автором результати роботи. Розділ містить детальний опис отриманих автором результатів стосовно уведення у культуру *in vitro* рослин шляхом поверхневої стерилізації насіння та їх мікроклонального розмноження. З'ясовано, що оптимальним для мікроклонування було середовище B5, доповнене 0,1–0,2 мг/л кінетину або 0,1 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти. Було також підібрано умови для індукції і проліферації калюсу та отримано тривало вирощувану культуру тканин

із експлантів рослин шести локалітетів. Визначено, що інтенсивність калюсогенезу залежала як від мінерального складу живильного середовища, так і від співвідношення і концентрації регуляторів росту, а також від місця зростання рослини-донора та типу експланту. При проведенні досліджень, спрямованих на індукцію калюсоутворення, виявлено, що з утвореного калюсу пагонового та кореневого походження за використання рослин з островів Дарбо, Галіндез, Скуа, Великий Ялур, Лехіл та мису Расмуссен, відбувалася спонтанна регенерація пагонів. Органогенез відбувався не лише одразу після індукції калюсної тканини, але й при тривалому її культивуванні. Встановлено, що ефективність органогенезу залежить від мінерального складу живильного середовища та концентрацій у ньому регуляторів росту.

Автором не тільки було уведено у стерильну культуру рослини *D. antarctica* та визначено умови їх мікроклонального розмноження та регенерації пагонів, але й досліджено генетичну мінливість таких розмножених рослин із використанням ПЛР-аналізу та цитогенетичного аналізу. Вивчено клональне потомство п'яти отриманих із насіння рослин, які походили з островів Дарбо (генотипи DAR12, DAR15), Галіндез (генотип G/D12-2а, G/D 20) та Скуа (генотип S7). Отримані результати свідчать, що розроблена автором методика мікроклонального розмноження забезпечує збереження генетичних характеристик *D. antarctica* в процесі тривалого культивування *in vitro* і, таким чином, може бути використана для отримання генетично однорідного рослинного матеріалу.

У розділі проаналізовано також результати дослідження впливу йонів кадмію на ріст рослин *D. antarctica*, які культивували *in vitro*. У результаті дослідження виявлено, що наявність  $Cd^{2+}$  у живильному середовищі у концентрації 1,5–20 мМ призводять до зупинки росту та загибелі рослин. Про це свідчили морфологічні зміни у дослідних рослинах, які проявлялася вже через сім діб культивування. При вирощуванні *D. antarctica* у живильному середовищі з  $Cd^{2+}$  у концентрації 1,5–20 мМ упродовж 3–4 тижнів відбувалося також зменшення біомаси рослин на 20 % - 70 %. За присутності у живильному

середовищі 5–20 мМ  $\text{Cd}^{2+}$  рослини гинули через 3 тижні, 1,5–5 мМ  $\text{Cd}^{2+}$  – через 4–6 тижнів культивування. Встановлено, що *D. antarctica* зберігає здатність виживати за умови, коли концентрація  $\text{Cd}^{2+}$  у живильному середовищі не перевищує 1 мМ.

Отже, дисертантом розроблено спосіб отримання вихідного асептичного матеріалу *D. antarctica*, що полягав у стерилізації і пророщуванні *in vitro* стратифікованого насіння. Спосіб дозволяє одержувати впродовж усього року життєздатні морфологічно нормальні проростки цього виду. Встановлено здатність експлантів *D. antarctica* до спонтанної регенерації *in vitro* та розроблено спосіб мікроклонального розмноження рослин цього виду. Висновки, які зроблені здобувачем, у цілому відповідають меті і завданням дисертації та обґрунтовані експериментальним матеріалом. Матеріали дисертації викладено у 16 друкованих працях, у тому числі у 8 статтях (з них 7 опубліковано у фахових виданнях, перелік яких затверджений ДАК МОН України, 1- у інших виданнях), та тезах 8 доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити ряд зауважень.

1. У Переліку умовних позначень, скорочень і термінів є некоректне скорочення, а саме написано «СТАБ» (стор. 17). Якщо це скорочення українською мовою, то має бути «ЦТАБ» (цетил-триметил-амоніум-бромід), якщо англійською, то має бути «СТАВ» (cetyl trimethyl ammonium bromide).

2. Автор не пояснює, у чому полягає «комплексний підхід до отримання культури тканин і органів» (стор. 22).

3. У розділі «Огляд літератури» наведено відомості щодо особливо високих концентрацій іонів кадмію у ґрунтах Антарктики (підрозділ 1.2, посилання №№ 9, 30). Разом з тим, опубліковані у наведених статтях та взяті автором за основу висновки щодо надзвичайно високого рівня  $\text{Cd}^{2+}$  у ґрунтах Антарктики є достатньо спірними. Наприклад, на сайті ICA (International Cadmium Association, <http://www.cadmium.org/environment/level-of-cadmium-in-the-environment>) вміст кадмію у кількості від 0,1 до 0,5 мг/кг визнається досить

поширеним у ґрунтах на Землі. То чи дійсно Антарктика так забруднена кадмієм?

4. У цьому ж розділі (стор. 44-46) недостатньо повно розглянуті публікації щодо чутливості/стійкості рослин до  $\text{Cd}^{2+}$ , не наведено припустимо граничні концентрації  $\text{Cd}^{2+}$ , за яких не відбувається порушення росту рослин. Такі відомості вважаємо за необхідні, оскільки у своїй роботі автор робить висновок про високий рівень стійкості антарктичних рослин до цього іону.

5. Вірогідно, було би необхідним проведення порівняння кліматичних умов у ті роки, коли було здійснено збір насіння, адже за різних умов у різні роки може бути і різна схожість насіння. Встановлені автором відмінності у проростанні насіння можуть бути зумовлені саме кліматичними відмінностями у різні польові сезони на різних ділянках збору насіння, а не результатом того, що насіння зібране з різних островів.

6. Вважаємо за недоцільне подання підрахунку загального відсотку регенерації «на усіх середовищах, на яких відбувалася регенерація» (табл. 3.2, стор. 88).

7. Стосовно розділу «Дослідженням впливу йонів кадмію на ріст *D. antarctica*» (розділ 5, зі стор. 102) є ряд питань. Чим обґрунтовується вибір саме кадмію як токсичного металу для дослідження діапазону стійкості рослин *D. antarctica*? Чи проводили попереднє дослідження на рідкому середовищі, адже кадмій випадає у осад у середовищі, де є фосфати, сульфати, хелатори, таким чином стаючи нетоксичним для культивованих на цьому середовищі рослин? Чи можна казати про підвищену стійкість до кадмію, якщо злакові взагалі відомі досить високою стійкістю до цього металу? Чи можна говорити про вплив високого вмісту кадмію у антарктичних ґрунтах на підвищення стійкості рослини до цього металу, якщо не наведено конкретні дані щодо аналізу вмісту сполуки саме у тих точках, де збирали насіння? Чи можна казати про адаптацію рослин до кадмію при тривалому культивуванні, чи може просто за період культивування кадмій перейшов у іншу, нетоксичну для рослин форму?

8. У тексті дисертації присутні мовно-стилістичні вади. Зокрема, це некоректне використання родового відмінку термінів українською мовою, наприклад, написано «токсиканта» замість «токсиканту» (стор.22), а також некоректне використання слів, що не відповідають вкладеному у них змісту – наприклад, використання слова «володіти» (стор.26) у значенні «мати властивості». Відповідно до Академічного тлумачного словника української мови (<http://sum.in.ua/s/volodity>), це слово означає «Мати що-небудь у своїй власності; Опанувати, охоплювати когось (про думки, почуття); Мати можливість підкоряти когось своєму впливові, своїй волі та ін.».

9. У переліку цитованих джерел з 291 посилання майже половина опубліковано більше 10 років тому. Хотілося би бачити більше нових публікацій.

Однак, зазначені зауваження і побажання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Підсумовуючи викладене, слід визначити, що дисертаційна робота Загричук Оксани Михайлівни «Отримання культури *in vitro* *Deschampsia antarctica* DESV та її фізіолого-генетичне вивчення» є завершеним науковим дослідженням, яке містить постановку завдань, їх вирішення, аналіз отриманих результатів та подання відповідних обґрунтованих висновків. Вважаю, що за актуальністю теми, методичним рівнем, новизною результатів і практичним значенням, кількістю друкованих праць, повнотою відображень у цих працях основних положень вказана робота відповідає «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 для кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Зав. лабораторії адаптаційної біотехнології

Інституту клітинної біології

та генетичної інженерії НАН України

д.б.н.



Н.А. Матвеева

Свєтліцкіна Т.В.