

ВІДЗИВ

офіційного опонента **Дробик Надії Михайлівни** про дисертаційну роботу
**Чумакової Вікторії Володимирівни «Фітогормональна та трофічна
регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*»,**
подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин

Актуальність теми. Робота Чумакової В. В. присвячена важливій проблемі сучасної фітофізіології – дослідженню регуляції процесів росту та розвитку рослин у пшениці м'якої – *Triticum aestivum* L. Одним із найважливіших етапів розвитку рослин озимої пшениці є процес яровизації, для нормального проходження якого необхідний комплекс взаємодіючих екзо- та ендогенних факторів. Вагомим фактором регуляції перебігу процесу яровизації є генетичний контроль, який у пшениці м'якої здійснюється системою генів *Vrn*, що контролює потребу в яровизації та визначає тип розвитку рослин та опосередковано її продуктивність. Фітогормональний статус і трофічне забезпечення також є вагомими факторами в регуляції флорального морфогенезу рослин, а також процесу яровизації.

Відомо, що нині використання методів культури *in vitro* стає одним з найпоширеніших інструментів досліджень, у тому числі і у фізіології рослин. Ці методи застосовуються у вивченні морфогенезу *T. aestivum* для одержання нових і вдосконалення існуючих сортів цієї культури тощо.

Нині дослідженню процесу яровизації пшениці м'якої приділяється значна увага дослідників. Однак, все ще недостатньо з'ясована роль взаємозв'язку трофічних, генетичних і фітогормональних факторів у регуляції перебігу яровизаційних процесів, а відтак і регуляції темпів розвитку пшениці озимої м'якої. Саме це й обумовило вибір теми дослідження, реалізація завдань якої дозволить автору поглибити існуючі уявлення про механізми регуляції розвитку пшениці м'якої та у майбутньому здійснювати регуляцію темпів

розвитку й тим самим, і продуктивності пшениці. Тому актуальність рецензованої роботи не викликає сумнівів.

Дисертаційне дослідження виконане в Харківському національному університеті імені В. Н. Каразіна у рамках низки проектів, зокрема: 811Н/12-18 «Розробити комплекс навчально-наукового обладнання для дослідження ефектів екзогенних індукторів спрямованості шляхів морфогенезу *in vitro* *Triticum aestivum* L. та *Glycine max* (L.) Merr.», «Дослідження молекулярно-генетичних і фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин *in vivo* та *in vitro*» №держреєстрації 0118U 002104.

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків. Наукові положення та висновки логічно впливають з фактичного матеріалу і носять об'єктивний характер, оскільки обґрунтовані результатами експериментальних досліджень. У дисертаційній роботі Чумакової В. В. використано NILs за генами *VRN*, отримані співробітниками селекційно-генетичного інституту України (м. Одеса) та сорти озимої пшениці, створені співробітниками Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААНУ (м. Харків).

Для дослідження цього матеріалу автором успішно застосовано сучасні адекватні методи.

Новизна отриманих результатів. За матеріалами наукових досліджень автором *вперше*:

- показана залежність алельного стану генів *VRN* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу; встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність корневих меристем за яровизаційного впливу; проведено аналіз алельного стану генів *VRN* у калусній культурі пшениці озимої; виявлено вплив контрастних трофічних умов яровизації та праймування гіберелінами на пролонговані ефекти регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої;

- встановлено, що за яровизації у калусній культурі озимої пшениці відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює процес

отримання рослин-регенерантів.

Практичне значення отриманих результатів. Результати дослідження можуть бути використані для обґрунтування нових методів регуляції темпів розвитку рослин озимої пшениці. Встановлена стимуляція морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* за дії яровизації та оптимізація фітогормонального складу живильного середовища можуть використовуватися у біотехнологічних дослідженнях *T. aestivum*.

Позитивним є те, що результати дисертаційної роботи уже використовуються у навчальному процесі на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна при викладанні нормативного курсу «Фізіологія і біохімія рослин», а також спецкурсів «Системність регуляції онтогенезу рослин», «Прикладна біохімія та біотехнологія рослин», а також «Методи культури *in vitro* вищих рослин».

Рекомендації щодо подальшого використання результатів роботи та доцільність продовження і розвитку відповідних досліджень.

Результати дослідження трофічної, генетичної та фітогормональної регуляції яровизаційного процесу можуть стати підґрунтям для розробки нових методів та прийомів регуляції темпів розвитку рослин озимої пшениці. Отримані експериментальні дані та узагальнення мають важливе значення для розуміння механізмів регуляції пластичності онтогенезу рослин пшениці м'якої. Встановлені особливості стимуляції позитивними температурами та оптимізацією фітогормонального складу живильного середовища морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* можуть бути враховані у подальших біотехнологічних дослідженнях пшениці м'якої.

Повнота використання в роботі наукової літератури у даній галузі. Список використаних літературних джерел включає 217 посилань, із них більшість – в іноземних виданнях (139), що дозволяє повністю охарактеризувати сучасний стан розробки проблеми в світі.

Оцінка наукової та літературної якості складу матеріалу і стилю дисертації та автореферату. Дисертація і автореферат Чумакової В. В.

написані у традиційній формі, оформлені відповідно до вимог ДАК МОН України. Дисертація викладена на 183 сторінках комп'ютерного тексту і складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Робота добре ілюстрована – містить 42 рисунки і 19 таблиць, які допомагають кращому сприйняттю отриманих автором результатів.

У **Вступі** дисертант вказує на актуальність дослідження комплексних механізмів систем яровизаційного контролю росту, розвитку та онтогенезу рослин пшениці м'якої. Обґрунтовує доцільність вивчення яровизаційного процесу *in vivo*, а також з використанням культури *in vitro*. Вивчення регуляції систем контролю темпів розвитку пшениці у зв'язку зі змінами клімату та різкими температурними перепадами протягом зимового періоду актуальне для підвищення адаптивності нових сортів.

Розділ 1 «Яровизаційний процес як фактор регуляції програми розвитку озимої м'якої пшениці» включає п'ять підрозділів, у яких Чумаковою В. В. проаналізовані дані стосовно фізіологічної природи, фітогормонального, генетичного та епігенетичного контролю яровизації у рослин озимої м'якої пшениці, а також наведені дані про роль трофічних факторів у яровизації. Проаналізовані відомості щодо калюсної культури як модельної системи дослідження морфогенезу за яровизації. З'ясовані недостатньо досліджені аспекти фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного процесу.

Огляд літератури написаний ґрунтовно із залученням значної кількості сучасних вітчизняних та іноземних наукових джерел з досліджуваної тематики. Слід зазначити, що кожен із розділів огляду є своєрідною теоретичною основою для експериментальних підрозділів, що наводяться автором у дисертаційній роботі. Наприкінці «Огляду літератури» автором зроблено короткий підсумок і обґрунтовано необхідність проведення досліджень, яким присвячена дисертаційна робота. Це, з нашої точки зору, важливо, оскільки дозволяє краще зрозуміти представлений у роботі експериментальний матеріал.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» автором наведено відомості щодо рослинного матеріалу, використаного у роботі; охарактеризований методичний підхід, умови та методи досліджень; представлені загальні схеми проведення експериментів *in vivo* та *in vitro*; описано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), що використовувалася для визначення алельного стану генів *VRN*, методику проведення цитологічних аналізів – визначення мітотичного індексу (MI), біохімічних аналізів – визначення вмісту розчинних вуглеводів; морфофізіологічних та фенологічних досліджень. Охарактеризовані основні біотехнологічні методи, використані в роботі – введення в культуру *in vitro*, отримання первинної та пасивованої калюсної культури пшениці м'якої, умови культивування на регенераційному середовищі за дії низьких позитивних температур та гіберелової кислоти (ГК₃). Подано статистичний аналіз отриманих результатів.

Опис методів та методик автором проведено чітко та конкретно. Саме раціональний підбір методичних підходів забезпечив успішну реалізацію основних завдань дисертаційної роботи.

У розділі 3 «Молекулярно-біологічний контроль яровизаційного процесу» автором наведені результати досліджень алельного стану локусів генів яровизації та співставлення його з темпами розвитку пшениці за різних трофічних умов яровизації та за культивування *in vitro*. Встановлено, що ізогенні за генами *VRN* лінії пшениці м'якої відрізняються за алельним станом цих генів, що обумовлює різні темпи їх розвитку. Автором показано, що яровизація проростків протягом 45 діб за різного трофічного забезпечення зумовлює зміну у алельному стані гена *Vrn-B1*, головного репресора переходу до цвітіння пшениці озимої. З'ясовано, що в пасивованій калюсній культурі 2–3 пасажів ізогенних за генами *VRN* ліній зберігається алельний стан локусів генів потреби у яровизації, подібно тому, який характерний для рослин *in vivo*.

У розділі 4 «Вплив контрастних трофічних умов яровизації на ріст та розвиток сортів озимої м'якої пшениці» автором подано результати дослідження проліферативної активності кореневих меристем за контрастних

трофічних умов яровизації. Встановлено, що 3 %-вий розчин сахарози стимулює мітотичну активність корневих меристем у проростків, яровизованих без ендосперму. Виявлено, що контрастні умови трофічного забезпечення яровизаційного процесу обумовлюють динаміку змін лінійного росту, накопичення біомаси та вмісту розчинних вуглеводів у яровизованих проростках досліджуваних сортів. Показано, що темпи розвитку рослин досліджуваних сортів залежали від рівня трофічного забезпечення проростків за яровизації. Автор робить висновок про залежність ростових процесів, вмісту розчинних вуглеводів та темпів розвитку рослин пшениці озимої, які вирощені з яровизованих проростків, від рівня трофічного забезпечення процесу яровизації.

У розділі 5 «Фітогормональна регуляція яровизаційного процесу» автором представлено результати аналізу впливу гіберелінів в період яровизації на ріст і вміст розчинних вуглеводів у проростках озимої пшениці. Встановлено, що праймування ГК₃ у період яровизації стимулює ростові процеси та біосинтез розчинних вуглеводів за рахунок фракції олігоцукрів. Досліджено, що пролонгована дія оптимальних умов трофічного фактора та праймування фітогормоном ГК₃ на темпи розвитку проявляється у прискоренні переходу до колосіння. Автор робить припущення, що це є фенотиповим доказом позитивного впливу досліджуваних факторів на експресію генів *VRN*.

Розділ 6 «Дослідження яровизаційного процесу в системі культури *in vitro*» присвячено розгляду результатів дослідження впливу тривалості яровизації та фітогормонального складу регенераційного середовища МС на прояв морфогенетичних реакцій в калюсній культурі сортів озимої пшениці. Дисертантом виявлено, що низькотемпературний вплив на калюсну культуру – яровизація – стимулює прояв морфогенетичних процесів, особливо після її завершення – на 45-ту добу. Показано, що додавання в живильне середовище МС гіберелінів у концентрації 0,5 мг/л значно стимулює морфогенетичні реакції калюсів та ефективність процесу отримання рослин-регенерантів у культурі *in vitro*. Автор припускає, що у культурі *in vitro*, як і в умовах *in vivo*, відбуваються

яровизаційні процеси, зумовлюючи експресію генів *VRN*, ефекти яких проявляються у стимуляції морфогенезу.

Важливою, на наш погляд, є наявність у дисертації розділу «Узагальнення», який дозволяє виокремити найважливіші теоретичні та практичні результати дисертаційної роботи. У ньому автором проводить загальний аналіз результатів досліджень та виявлених ефектів; формулює висновок про те, що фітогормональні і трофічні фактори у взаємозв'язку між собою та з генетичними факторами відіграють істотну роль у регуляції яровизаційних процесів, а відтак і темпів розвитку пшениці озимої м'якої.

Висновки, які зроблені здобувачем, у цілому відповідають меті і завданням дисертації та обґрунтовані експериментальним матеріалом.

Автореферат у цілому відповідає змісту дисертації.

Повнота викладу основного змісту дисертації в опублікованих працях у наукових виданнях, затверджених ДАК МОН України. Основні положення дисертаційної роботи відображені у 28 публікаціях, що включають 6 статей у провідних фахових виданнях України (у т.ч. 1 стаття – у виданні, що входить до наукометричної бази Web of Science), 1 стаття у зарубіжному виданні та 20 публікацій – у матеріалах та тезах міжнародних конференцій.

Водночас, до дисертаційної роботи можна висловити низку *побажань і зауважень*.

1. У тексті дисертаційної роботи зустрічається багато скорочень – МІ, ПСК, ГК та ін.; вони розшифровані автором при першому згадуванні. Однак, для кращого їх сприйняття у великому за обсягом тексті дисертації доцільним було б подати переліку умовних скорочень термінів, що зустрічаються, на початку дисертаційної роботи.

2. Назва підрозділу 1.5 «Культура *in vitro* – модельна система в біології рослин» занадто загальна, як і представлений у ньому широкий спектр питань стосовно культивування *in vitro* ізольованих рослинних клітин, тканин та органів, описані загальновідомі факти та відомості, що швидше відповідає представленню матеріалів у навчальних виданнях. Доцільним було привести

більш концентрований аналіз даних щодо використання культури *in vitro* у розрізі досліджуваної тематики. Крім того, у назві Розділу 6 «Дослідження яровизаційного процесу в системі культури *in vitro*» доцільно було б вилучити слово системі, оскільки культура *in vitro* і є системою.

3. Для кращого сприйняття структури роботи і великого масиву проведених автором дослідів у роботі наведені схеми досліджень за умов *in vivo* (рис. 2.1) та *in vitro* (рис. 2.2). Ці схеми сприймаються розрізнено, тому доцільно було б їх уніфікувати і, якщо не об'єднувати в одну схему, то хоча б зробити більш структурованими та деталізованими для обґрунтування необхідності проведення кожного етапу роботи.

4. У підрозділі дисертаційної роботи 3.1 дисертант наводить результати, що стосуються аналізу алельного стану генів *VRN* (табл. 3.1), де лінія Ольвія сорт та лінія Ольвія *Vrn 3* мають однаковий генотип, але різняться за типом розвитку. Доцільно було б дати пояснення такому факту.

5. Є не зовсім зрозумілим і потребує пояснення той факт, що у роботі в різних експериментальних розділах досліди проведені на різних сортах та ізогенних лініях. Підрозділи 3.1-3.3 – сорти Миронівська, Ольвія та моногенодомінантні майже ізогенні за генами *VRN* лінії (NILs); підрозділи 4.1 та 4.3 – сорти озимої пшениці Статна та Дорідна, підрозділи 4.3 – сорти Статна, Дорідна, Досконала; підрозділи 5.1 та 5.2 – сорти Статна, Дорідна, Альянс; підрозділи 6.1, 6.2 – сорти Статна, Дорідна, Астет.

6. У тексті дисертаційної роботи при описі результатів експериментів іноді різним чином вказуються варіанти дослідів – «ізольовані зародки» або «проростки без ендосперму». Це вносить складність сприйняття та неоднозначність інтерпретації поданого тексту.

7. У загальних висновках роботи слід було б зазначити не лише теоретичне, а й можливе практичне значення отриманих результатів. Сьомий висновок потрібно було б пояснити, навести можливі припущення отриманих результатів, оскільки відомо, що генетична гетерогенність калюсної культури достатньо широко проявляється за її субкультивування. Потребують пояснення

2, 4 та 8 висновки, які є декларативними і лише констатують отримані результати.

8. Перевагою рецензованої роботи є супровід її текстової частини численними рисунками і таблицями. Однак, є зауваження, що стосуються рисунків. Зокрема, рис. 3.2. є нечітким, на рис. 3.9 подано фото різного масштабу, на рис. 4.16 та 5.4 представлені рослини у фазі колосіння, але не має позначень, ніяких суттєвих відмінностей між лініями рослин не видно, очевидно, через нечіткість фото, і тоді незрозуміло смислове навантаження цих фото. Також корективи слід було б внести до позначень, наприклад, у підписи до рис. 6.2 та 6.3. – замість «Т» і «Х» – «контроль» та «дослід».

9. Стосовно оформлення роботи, то: повні латинські назви родів і видів доцільно подавати з зазначенням автора, який запропонував назву цього таксона, лише при першій згадці у тексті і далі використовувати лише скорочену родову та повну видову назви, за тими винятками, коли в одному і тому ж тексті мова йдеться про види різних родів і скорочення родової назви викликає утруднення сприйняття матеріалу. У роботі також є орфографічні та стилістичні помилки, русизми та технічні помилки. Зокрема стор. 60, 74 – злиті слова, стор. 74 ПВК замість ПСК, зустрічаються повтори у тексті тощо. Автором часто використовуються складносурядні і складнопідрядні речення, і тому текст складний для сприйняття, або зміст речення не відповідає тому, який дисертант хотів у нього вкласти.

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

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Даючи оцінку дисертаційної роботи Чумакової В. В. у цілому, слід зазначити, що вона є завершеним науковим дослідженням, яке містить вирішення завдання – вивчення впливу трофічної та фітогормональної регуляції яровизаційного процесу сортів озимої м'якої пшениці за умов *in vivo* та *in vitro*.

Вважаю, що робота «Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*» за своєю актуальністю, обсягом виконаних досліджень, їхнім теоретичним і практичним значенням, відповідає вимогам пунктів 9, 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами внесеними згідно з постановами КМ №656 від 19.08.2015; №1159 від 30.12.2015; №567 від 27.07.2016; №943 від 20.11.2019; №607 від 15.07.2020), а її автор, Чумакова Вікторія Володимирівна, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин.

Офіційний опонент,

доктор біологічних наук, професор,

декан хіміко-біологічного факультету,

завідувач лабораторії екології та біотехнології

Тернопільського національного педагогічного

університету імені Володимира Гнатюка



Handwritten signature of H. M. Drobik

Н. М. Дробик

