

ВІДГУК

на дисертаційну роботу **Любченко Інни Олександрівни** «Створення вихідного матеріалу рижію ярого стійкого до стресових чинників за використання біотехнологічних методів», подану на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Глобальне потепління, ознаки якого чітко проявляються в останні десятиріччя в Україні, потребує впровадження нових сортів сільськогосподарських культур, головною особливістю яких є толерантність до недостачі вологи в ґрунті та підвищених температур повітря. Тому викладені в дисертаційній роботі дослідження є актуальними як в теоретичному плані, так і в практичній селекційній роботі.

Багаторічні дослідження дисертантки проводились у відповідності з науковою програмою Уманського національного університету садівництва «Оптимізація використання природного і ресурсного потенціалу агроєкосистеми Правобережного Лісостепу України» (№ державної реєстрації 0101U004495, 016U003207), підпрограма «Розробка генетичних та біотехнологічних методів у селекції сільськогосподарських культур».

Актуальність теми полягає у розробленні селекційної схеми створення вихідного матеріалу рижію ярого, стійкого до абіотичних факторів, зі залученням до неї біотехнологічних методів. Були вивчені особливості одержання калюсної тканини, її проліферації та диференціації, вплив на ці процеси різних факторів, які сприяли оптимізації проходження цих процесів. Шляхом добору на живильному середовищі зі селективним чинником виділені стійкі клітинні лінії, які були доведені до рівня цілісної рослини.

Мета дослідження – обґрунтувати теоретичні й практичні основи використання біотехнологічного методу в селекції рижію ярого з метою створення стійкого до абіотичних чинників вихідного матеріалу. Для її вирішення авторка дисертації добрала живильні середовища для індукування, культивування та морфогенезу калюсної тканини, виявила оптимальні кількості селективних чинників, виділила стійкі клітинні лінії, отримала із них рослини-регенеранти, провела оцінювання створених соматоклональних ліній за комплексом господарсько-цінних ознак у польових умовах. Таким чином був проведений повний цикл створення оригінальної селекційної лінії від калюсної тканини до вирощеної у польових умовах рослини.

Наукова новизна одержаних результатів визначається розробленням способів індукування та культивування калюсної тканини, доббором та модифікацією живильного середовища для цих процесів, а також виявлено оптимальну концентрацію стресових чинників для ведення добору на стійкість *in vitro*. Запропонована багатоступенева схема добору стійких до хлоридного засолення клітинних ліній, об'єктивність якої підтверджена польовими дослідженнями. Розроблена технологія одержання вихідного матеріалу з комплексною стійкістю до хлоридного та осмотичного стресу дозволяє пришвидшити селекційний процес для одержання високоадаптованих сортів рижію ярого.

Практичне значення роботи. Розроблено спосіб індукування калюсної тканини рижію ярого для ведення клітинної селекції (патент № 136523). Добрані живильні середовища для індукування, пасажування, морфогенезу та регенерації рослин в процесі багатоступеневої схеми селекції. Одержані методом клітинної селекції лінії, які характеризуються комплексною стійкістю до засолення та осмотичного стресу і несуть комплекс господарсько-цінних ознак знайдуть застосування в селекційній роботі в інших науково-дослідних установах.

Основні результати наукової роботи повно обговорені на Міжнародних і Всеукраїнських науково-практичних конференціях та опубліковані в наукових журналах та матеріалах наукових конференцій, отримано патент на корисну модель.

Дисертаційна робота Любченко І.О. викладена на 197 сторінках комп'ютерного набору і включає 184 сторінки основного тексту. Вона містить анотацію, вступ, п'ять розділів, висновки, рекомендації селекційній практиці, список використаних літературних джерел включає 277 найменувань, з яких 81 латиницею, дев'ять додатків. Роботу ілюстровано 18 рисунків і 42 таблицями.

В анотації розглянуто короткий зміст дисертаційної роботи та список опублікованих праць за темою дисертації.

У вступі обґрунтоване значення рижію ярого як цінної сільськогосподарської культури, яка виділяється невибагливістю до умов вирощування та високим умістом цінної олії. Тут також викладено актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, мета, завдання і методи досліджень, наукова новизна одержаних результатів, практичне значення роботи, особистий внесок здобувача, апробація результатів дисертації, публікації, обсяг і структура дисертації.

У розділі 1 обґрунтована необхідність використання біотехнологічних методів у генетично-селекційних дослідженнях рослин, позитивні їх сторони, обговорені найбільш важливі досягнення та проблеми. Стверджується, що для селекційної роботи найбільш важливою є культура калюсних тканин. Авторка дисертації відмічає залежність наростання калюсної тканини від таких зовнішніх факторів, як інтенсивність, тривалість і тип освітлення, температури, газового складу, осмотичного тиску, кислотності живильного середовища та його хімічного складу. У процесі культивування калюса виникає соматоклональна мінливість, яка є важливим джерелом одержання генетичного різноманіття. Крім того, при цьому має місце зайва кількості та морфології хромосом, точкові мутації, транспозиції генетичних елементів, ампліфікація генів, перегрупування цитоплазматичних геномів, соматичний кросингвер. Значне місце у цьому розділі відведене характеристиці реакції рослин на дефіцит вологи в ґрунті та зволоження. Наведені механізми адаптації та стійкості рослин до цих абіотичних чинників. Обґрунтовані переваги застосування клітинної селекції порівняно з традиційною для створення адаптивного вихідного матеріалу, стійкого не лише до абіотичних факторів, а й до низки хвороб, особливо до корневих гнилей, борошнистої роси, іржі. Охарактеризована низка досліджень *in vitro* з рижієм ярим, в яких продемонстровані особливості регенерації калюсних культур їх характеристика одержаних рослин.

У розділі 2 викладені агрометеорологічні умови, матеріали та методи досліджень. Наведена характеристика сортів Степовий, Клондайк, Перемога й Євро 12, експланти яких були використані в дослідженнях *in vitro*. Біотехнологічні дослідження виконували в навчально-науково-виробничій лабораторії Уманського національного університету садівництва. У роботі використовували методи і умови культивування тканин *in vitro* за Р.Г. Бутенко. Тривалість фотоперіоду складала 16 годин, інтенсивність освітлення – 4 кЛк, температура – 20-24°C, відносна вологість повітря – 75 %. Тривалість міжпасажного періоду – 30-35 діб.

Вирощування створеного рослинного матеріалу за польових умов проводили на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва. Рослини-регенеранти висаджували у відкритий ґрунт за схемою 45×10 см. Наступні покоління (R₁–R₄) вирощували за ширини міжрядь 30 см. Нормою висіву 2 млн насінин/га. Наведені детальна характеристика ґрунту, кількість опадів, сума активних температур, вологість повітря.

Методика проведення лабораторних досліджень включала стерилізацію експлантів (насіння та проростки), поміщали їх на живильні середовища Мурасіге-Скуга, Гамборга та Шеніга-Хильдебранта, які різнилися вмістом і співвідношенням мікро- та мікроелементів. Індукцію калюсогенезу проводили шляхом модифікування регуляторами росту в різних концентраціях. Морфогенні показники калюсних тканин визначали на основі 6 – бальної шкали. Ідентифікацію плідності проводили шляхом підрахунку кількості хромосом у давлених препаратах, отриманих із калюсу чи соматичних клітин за методикою З.П. Паушевої. Соле- та посухостійкі соматоклональні клітинні лінії виявляли шляхом додавання до живильного середовища хлориду натрію або маніту. Ці ж селективні чинники використовували також для оцінки стійкості інтактних рослин в процесі вирощування насіння.

У польових умовах вирощування рослин і проведення обліків виконували згідно методики польових досліджень і методики експертизи сортів рослин на відмінність, однорідність та стабільність.

У розділі 3 розглянуті умови індукування та культивування калюсної тканини рижію ярого. Дослідження показали, що найкраще стерилізував насіння гіпохлорид натрію (комерційний препарат «Білизни») за розведення його водою у співвідношення 1:2 впродовж 20 хв. Для стерилізації проростків оптимальним виявили перманганат калію у концентрації 1 % за 10-хвилинної експозиції. Найвищий приріст біомаси експлантів як насіння, так і проростків мало місце за стерилізації 70 %-ним етанолом за експозиції 10-20 хв.

При вивченні процесу калюсогенезу, як експлантат, використовували проростки рижію ярого сорту Степовий 1, які культивували на живильних середовищах. Установлено, що найбільш інтенсивне індукування калюсної маси одержали на середовищі Мурасіге-Скуга модифікованому невисокими концентраціями ауксинів і підвищеними цитокінінів. Подальший розвиток калюсів проходив шляхом гемогенезу, тобто формуванням адвентивних пагонів на поверхні тканини. Їх розвиток суттєво залежав від концентрації 6-бензиламінопурина. Додавання до живильного середовища навіть незначної

кількості 2,4-Д – різко гальмувала регенераційні процеси. Тому найвищий вихід рослин-регенерантів з одного калюса спостерігали за наявності в живильному середовищі 1,0 мл/л 6-бензиламінопурину і повної відсутності 2,4-Д.

Висвітлені в розділі 4 результати присвячені клітинній селекції рижію ярого на стійкість до стресових чинників. З цією метою для ефективного добору в живильному середовищі створювали високий рівень хлоридного засолення, що викликало пригнічення ростових процесів і регенераційної здатності. Після 4-5 діб культивування за таких умов відбувалося зниження інтенсивності проліферації, потемніння калюсної біомаси, втрату структури та утворення некротичних зон. У подальшому фіксували загибель не солестійких калюсів. На основі варіювання різних рівнів засолення установили, що наявність 1,25 % NaCl в живильному середовищі дає можливість об'єктивно провести ранжирування генотипів за рівнем солестійкості. Найбільший вплив на виживання за таких умов виявив генотип експланту. Авторкою дисертації чітко доказано, що для підвищення стійкості калюсної культури потрібно проводити ступеневу клітинну селекцію, тобто поступове збільшення концентрації NaCl у живильному середовищі. Спочатку добирають клітинні лінії за умов низького вмісту солі (0,5 %), а потім ті, що вижили переносили на селективне середовище з підвищеним рівнем засолення. Таким методом було добрані 56, 35, 4, 4 ліній сортів Перемога, Степовий, Євро 12 і Кландайк відповідно. Виділені калюжного походження лінії характеризувались чіткими морфогенними показниками. Необхідно зазначити, що вони різнилися показниками наростання біомаси як в контрольному варіанті, так і в присутності селективного агенту.

Добрані *in vitro* стійкі до засолення клітинні лінії переносили на модифіковані живильні середовища для отримання рослин-регенерантів. Загалом із 99 клітинних ліній за контрольних умов морфогенез проходив у 65 ліній, що становить 65,7 %. За присутності хлориду натрію цей показник знизився до 56 ліній, тобто до 56,6 %. Виживання регенеративних рослин за високого рівня засолення суттєво залежало як від генотипу калюса, так і від фону, на якому були отримані рослини-регенеранти (контрольний або стресовий). Авторкою дисертації загалом було виділено 224 рослинні лінії, які зберегли солестійкість при переході з клітинного рівня на рослинний.

З метою виділення посухостійких форм Любченко І.С. використала таку осмотично активну речовину як маніт, який здатний знижувати вихідний потенціал культурального середовища. Вона установила, що для ранжування клітинних структур за рівнем стійкості до цього чинника оптимальна концентрація становить 8 %. Із сортів Степовий 1 і Перемога на селективному середовищі виділені експланти, які можуть слугувати донорами стійкості для створення посухостійкої калюсної культури.

У розділі 5 наведені результати оцінки створення соматоклональних ліній за польових умов. Зазначається, що значна частина зразків характеризувалась низькою життєздатністю, рослини були нетиповими та стерильними. У цілому, насіння сформували 68 соматоклональних ліній, що становило 30,3 % від загальної кількості, що вирощувались у відкритому ґрунті. Низка соматоклональних рослинних ліній, отриманих зі сортів Степовий 1 і Перемога, виділились підвищеною інтенсивністю нарощування біомаси проростків і

схожості насіння за комплексної дії засолення та осмотичного стресу. Вирощування у польових умовах впродовж 2017-2019 рр. виявило низку сортозразків, які характеризувались високою польовою схожістю та збереженістю рослин. Вони суттєво різнилися тривалістю періоду вегетації, проявляли індивідуальні морфологічні й господарські ознаки та елементи продуктивності.

Необхідно зупинитись на деяких зауваженнях та побажаннях автору дисертації:

1. На стор. 35 за характеристики дії посухи на рослини Любченко І.О. зазначає, що аквапоринові водні капели відіграють важливу роль у регуляції водного обміну та гідравлічного опору в кореневій системі. Поскілки в останні роки питання передачі води рослинами за умов посухи за участі аквапоринів приділяється дуже багато уваги, то вважаю, що це питання потрібно було висвітлити в більш розширеному варіанті.
2. Не зовсім зрозумілий метод оцінки рослин-регенерантів за біологічними та господарсько цінними ознаками в умовах *ex vitro* у досліді 7 (стор. 80). Авторка дисертації пише, що опис морфологічних ідентифікаційних ознак проводили методом візуальної оцінки, причому експертизі піддавали 120 рослин, розділених на три повторення. Не ясно, як формували набір рослин до кожного повторення? Чи рослини добирали довільно, чи застосовували якусь схему?
3. На стор. 94 (початок підрозділу 3.3) указується, що за умов *in vitro* розвиток калюсних клітин може відбуватися різними шляхами, в тому числі й «звикання рости на безгормональних середовищах». Я вважаю, що такий вираз потребує пояснення. Що значить з генетичної точки зору «звикання рослин». Чи це епігенетична дія генів, чи щось інше?
4. На стор. 117 (1 строчка зверху) зазначається, що після 4-5 діб культивування за умов засолення відмічається зниження інтенсивності проліферації, потемніння калюсної біомаси, втрата структури та утворення некротичних зон. Надалі фіксували загибель несолестійких генотипів. Мабуть правильніше буде замість «генотипів» написати «загибель калюсів».
5. У тексті на стор. 152 написано, що найбільшу кількість фертильних соматональних рослинних ліній отримали зі сорту Перемога у кількості 26 номерів, що складає 27,6 % від зазначеної кількості. Це механічна помилка, так як на рис. 5.2. указано, що насіння сформували 34 лінії, які походять від сорту Перемога, що складає 27,6 % від загальної їх кількості (123).
6. На стор. 164 авторка дисертації зазначає, що пізньостиглі сорти, зазвичай, врожайніші та стійкіші до стресових чинників. На жаль, така ситуація має місце не завжди. Це справедливо, в основному, за оптимальних умов, які складаються впродовж всього вегетаційного періоду. Але для багатьох культур, в тому числі й рижюю ярого, дуже часто в репродуктивний період наступають несприятливі умови – надзвичайно високі температури та дефіцит вологи в ґрунті. За такої ситуації кращий урожай формують скоростиглі сорти, особливо, якщо їх можливо висівати в ранні строки.

Відмічені зауваження у цілому не знижують високої оцінки дисертаційної роботи, поскільки, в основному, відносяться до її оформлення і не мають принципового характеру.

Одержані Любченко І.О. результати є суттєвим вкладом у сільськогосподарську науку, мають велике наукове та практичне значення, вони поглиблюють наші знання про можливість одержання цінного вихідного матеріалу сільськогосподарських культур біотехнологічними методами. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею, основні її положення достатньо повно викладені в опублікованих працях. Створені клітинні лінії рижію ярого, які несуть комплекс господарсько цінних ознак, будуть використані як у власній селекційній програмі, так й іншими селекційними установами.

За актуальністю теми, науково-методичним рівнем проведених досліджень, науковою новизною й обґрунтованістю результатів експериментів, висновків і практичних рекомендацій дисертаційна робота повністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», які ставляться до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук, а її авторка безумовно заслуговує присудження наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 06.01.05 – селекція і насінництво.

Офіційний опонент,
завідувач науково-технологічного відділу
розробки та впровадження інноваційних технологій
для інтенсифікації виробництва сільськогосподарської
продукції Одеської державної
сільськогосподарської дослідної
станції НААН, доктор біол. наук, професор
25.11.2020 р.



 Січкарь В.І.

Особистий підпис Січкаря В.І. засвідчую:
учений секретар Одеської державної
сільськогосподарської дослідної
станції НААН,
кандидат сільськогосподарських наук, доцент



Зорунько В.І.