

ВІДГУК

на дисертаційну роботу МЕЛЬНИЧУКА Олександра Васильовича «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антими́тотичних сполук динітроанілінового ряду», представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 — біотехнологія

Створення нових високоврожайних енергетичних культур, що можуть слугувати сировиною для отримання, зокрема, біоетанолу є наразі актуальною науковою проблемою у біотехнології. Серед таких культур особливу увагу привертає міскантус гігантський. Його врожайність може сягати 40 т/га сухої маси, проте він є алотриплоїдом, наслідком гібридизації між *M. sacchariflorus* та *M. sinensis*. Відомо, що триплоїди є стерильними, а наслідком стерильності є те, що всі комерційні плантації *M. × giganteus* представлені клонами одного генотипу. Стерильність унеможливорює селекційну роботу з поліпшення цієї культури традиційними методами.

Вирішити проблему стерильності може поліплоїдизація. Крім того відомо, що поліплоїдія часто веде до значного збільшення біомаси рослини, т.зв. гігантизму. Це явище було встановлено близько 100 років тому назад, а штучна поліплоїдизація в селекції рослин почала використовуватися у 1930-1940 рр. Проте відомі речовини-поліплоїдогени не завжди є ефективними, практично для кожного виду і навіть сорту рослин потрібно підбирати специфічні антими́тотичні сполуки і свій режим індукції поліплоїдних форм.

Серед таких сполук важливими, окрім природних сполук типу колхіцину, є похідні динітроаніліну, які характеризуються високим рівнем спорідненості до тубуліну. Проте відомі динітроаніліни характеризуються високим рівнем фітотоксичності. Пошук нових, менш токсичних сполук цього класу дозволить покращити ефективність поліплоїдизації не лише міскантусу, але й інших видів рослин. Саме тому роботу О.В. Мельничука «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антими́тотичних

сполук динітроанілінового ряду» метою якої була розробка ефективного методу поліплоїдизації міскантусу гігантського (*Miscanthus x giganteus*) в умовах *in vitro* за допомогою перспективних антимітотичних сполук динітроанілінового ряду зі зниженою фітотоксичністю та отримання поліплоїдних ліній цієї біоенергетичної культури для подальшої селекційної роботи, слід визнати важливою та актуальною як з практичного боку, так і для подальшої розробки фундаментальних основ сучасної біотехнології рослин.

Дисертаційну роботу побудовано за традиційним типом. Вона складається із анотації українською та англійською мовами, списку публікацій за темою дисертації, змісту, списку умовних позначень та скорочень, вступу, семи розділів, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та двох додатків, в одному з яких наведено перелік та характеристика сполук динітроанілінового ряду, використаних в роботі (Додаток А), а в іншому - список публікацій здобувача (Додаток Б). Текст зі списком використаної літератури (257 джерел), ілюстраціями (21 рисунок, 13 таблиць) викладено на 176 сторінках машинопису.

У вступі коротко обґрунтовується вибір теми дослідження та її актуальність; зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами; наведено мету і завдання дослідження; охарактеризовано об'єкт і предмет досліджень; коротко перераховані методи досліджень; викладено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів; наведено дані про особистий внесок здобувача, апробацію результатів дисертації та публікації, а також дані про структуру та обсяг дисертації.

Перші три розділи «Характеристика роду міскантус та перспективи його використання в біотехнології», «Міскантус як перспективна енергетична культура» та «Поліплоїдизація міскантусу» представляють собою огляд літератури. У цих розділах ретельно проаналізовано результати досліджень інших авторів та наявні у літературі відомості про міскантус як

об'єкт досліджень, його важливість для біотехнології як перспективної енергетичної культури, а також результати досліджень з особливостей поліплоїдизації та поліплоїдів міскантуса, отриманих іншими дослідниками. У цілому ці три розділи огляду літератури є аналітичними, містять науково обґрунтовані узагальнення. У ньому достатньо висвітлено останні експериментальні дані з питань, що мають відношення до теми дисертації. Огляд свідчить про ґрунтовні знання автором сучасного стану в даній галузі досліджень, уміння чітко викласти стан та перспективи досліджень, а також коротко і зрозуміло обґрунтувати актуальність, роль та значення власного дослідження у контексті накопичених світовою наукою знань та сучасних викликів.

Розділ 4 “Матеріали та методи досліджень” складається з трьох підрозділів. У перших двох описано об'єкт досліджень та матеріали, використані автором в роботі. У третьому з них коротко, чітко та ясно викладено методи досліджень. Автор у своїй роботі використав, зокрема, такий новітній метод як структурно-біоінформатичний добір перспективних сполук динітроанілінового ряду, метод культури *in vitro*, а також широкий спектр усталених класичних методів вивчення і характеристики отриманих поліплоїдів міскантуса. Аналіз наведених матеріалів свідчить, що автор використав сучасні методи, за допомогою яких отримано коректні результати, адекватні стосовно поставлених задач дослідження.

Розділ 5 «Структурно-біологічна оцінка взаємодії динітроанілінів з α -тубуліном міскантусу» складається з трьох підрозділів.

У короткому підрозділі 5.1 «Побудова просторової моделі молекули α -тубуліну міскантусу» наведено результати вивчення за допомогою методу множинного вирівнювання відібраних послідовностей α -тубуліну, які дали можливість використання амінокислотних послідовностей ізотипів α -тубуліну для реконструкції просторової структури цієї молекули з метою вивчення білок-лігандних взаємодій та екстраполяції отриманих результатів на інші відомі ізотипи α -тубуліну з високим рівнем ймовірності. Для

подальшої роботи відібрано послідовність Q70ZL7 α -тубуліну (ген TUA1) з *M. sinensis*. Отримано 5 промоделей просторової структури молекул α -тубуліну.

У підрозділах 5.2 та 5.3 наведено результати молекулярного докінгу похідних динітроаніліну з молекулою α -тубуліну міскантусу, які свідчать, що досліджені ліганди здатні утворювати комплекси з α -тубуліном і потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули, а оцінка рівня спорідненості 83 новосинтезованих динітроанілінів до α -тубуліну за критерієм стабільності комплексів та рівнем фітотоксичності дозволила відібрати 6 перспективних сполук для подальшого використання у дослідях з поліплоїдизації рослин.

Розділ 6 «Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro* та отримання його поліплоїдних ліній за допомогою динітроанілінів» складається з чотирьох підрозділів.

У підрозділі 6.1 «Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*» наведено результати пошуку ефективної методології поверхневої стерилізації вихідних корневих експлантів. Розроблено метод, що дозволяє отримати 82,2% стерильних експлантів, що є досить прийнятним для такого типу експлантів.

У підрозділі 6.2 «Розробка технології поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням динітроанілінів» наведено результати експериментів з підбору оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції калюсогенезу міскантусу сорту «Гулівер», які свідчать, що автору вдалося підібрати умови індукції калюсу з використанням різних експлантів та наступної регенерації з них рослин. Далі розглянуто особливості розроблених автором підходів поліплоїдизації міскантусу шляхом як непрямого, так і прямого морфогенезу на середовищах, які містили антимітотичні речовини. Регенеровані рослини вкорінювали та проводили подальші аналізи.

Далі, у підрозділі 6.3, розглянуто результати оцінки виживання отриманих ліній рослин. Встановлено, що за використання відібраних за допомогою методів *in silico* сполук для отримання поліплоїдів відбувалося зниження рівня фітотоксичності порівняно з трифлюораліном та оризаліном. Підкреслюється, що додавання оризаліну та трифлюораліну в живильне середовище призводить до пригнічення росту рослин, викликає деформації та викликає загибель експлантів міскантусу гігантського.

Проведеним автором аналізом хромосомних чисел отриманих поліплоїдних ліній (підрозділ 6.4) встановлено, що всі антимиотичні речовини динітроанілінового ряду, використані в роботі, індукували поліплоїдію *M. x giganteus*. У результаті цитологічних досліджень відібрано 43 поліплоїдні лінії. Поліплоїдні лінії мали 114 хромосом, що є властивим для гексаплоїдів *M. x giganteus* ($2n=114$), інколи спостерігали появу анеуплоїдних форм. Таким чином, автор встановив, що тестовані динітроаніліни, так само як і референтні, здатні індукувати поліплоїдію *M. x giganteus*, але не мають високого фітотоксичного впливу на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів. Досліджені лінії міскантусу гігантського було вегетативно розмножено та адаптовано до умов відкритого ґрунту.

Розділ 7 «Фенотипова характеристика поліплоїдних форм міскантусу та їх продуктивність» складається з 5-ти підрозділів.

Підрозділ 7.1 присвячено результатам вивчення морфометричних характеристик поліплоїдних ліній рослин. Наведено дані вимірювань висоти рослин, підрахунку кількості пагонів на рослину, середньої кількості листків на стеблах, кількості ризом на кореневищах. Виявлено рослини, які значно перевищували вихідний триплоїдний клон за вивченими показниками. Далі, у підрозділі 7.2 «Структура рослин та надземна маса поліплоїдних ліній рослин» наведено результати вивчення накопичення надземної біомаси та співвідношенням стебло/листя за вагою. Виявлено поліплоїдну лінію 108, яка за показником «сира маса надземної частини рослин», майже вдвічі

перевищувала показники контролю. У підрозділі 7.3 «Біохімічна характеристика отриманих поліплоїдних рослин (вміст сухої речовини, вміст золи)» показано, що вміст сухої речовини для всіх проаналізованих ліній міскантусу був у межах від 64,69 до 87,99 %, тобто нижчим, ніж у контролі. Результати визначення вмісту загальних цукрів та моноцукрів в зразках отриманих поліплоїдних ліній міскантусу (підрозділ 7.4) показали порівняно близький їх вміст у контролі і отриманих поліплоїдних лініях. За енергетичною цінністю проаналізовані лінії виявили певну різницю. Даний показник для них знаходився в межах від 3742 до 3953 ккал/кг. Найвищий показник енергетичної цінності мала лінія 202, на рівні 3953 ккал. Найнижчим показником енергетичної цінності характеризувалась лінія 107, для якої цей показник був на рівні 3742 ккал, тоді як у контролі - на рівні 3906 ккал. Розрахунок виходу біоетанолу (підрозділ 7.5) показав, що найпродуктивнішою є поліплоїдна лінія 202, яка перевищує показники контролю за виходом етанолу в середньому на 14,2%. Високопродуктивною за виходом біоетанолу виявилась також лінія 108, відповідні показники якої істотно перевищувала показники контролю та несуттєво поступалась лінії 202 за виходом етанолу з одиниці площі. Слід підкреслити також, що лише у рослин гексаплоїдної лінії 108 автор спостерігав викидання волотей.

У заключному розділі «Аналіз та узагальнення результатів» коротко, з елементами обговорення автор підсумував логіку проведення власних експериментів та головні отримані ним результати. Критичний аналіз отриманих результатів дозволив йому обгрунтовано підсумувати «...в дисертаційній роботі представлені результати використання нових перспективних сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro*, завдяки чому отримано і охарактеризовано 43 поліплоїдні лінії цього виду рослин з підвищеною продуктивністю. Відібрані сполуки динітроанілінового ряду з антимітотичними властивостями та низьким рівнем фітотоксичності можуть бути використані у біотехнології рослин як

для отримання поліплоїдів міскантусу гігантського та інших представників цього роду, так і для розробки методів поліплоїдизації інших видів рослин, для яких висока фітотоксичність вже відомих індукторів поліплоїдії є критичним і лімітуючим фактором. Отримані поліплоїдні лінії *M. × giganteus* слугуватимуть основою для створення нових сортів міскантусу гігантського, і подальшого залучення до селекційних процесів, оскільки є важливим джерелом збільшення генетичного різноманіття цього роду рослин. Найкращі зі створених поліплоїдних ліній міскантусу вже мають практичну цінність для безпосереднього використання у біоконверсії, оскільки характеризуються покращеними показниками продуктивності». Саме у цих словах, на мою думку, і полягає квінтесенція рецензованої кандидатської дисертації.

У цілому експериментальний матеріал викладено доступною мовою, чітко, лаконічно і логічно, основні результати достатньо підтверджено оригінальними та якісними ілюстраціями, зокрема, чіткими фотографіями, графіками та схемами. У процесі викладу автор ретельно і критично аналізує власні результати, робить у процесі опису коректні заключення та підсумки. Обговорення та узагальнення проведено чітко, на високому професійному рівні, із залученням літературних даних по всьому тексту дисертації, воно свідчить про те, що автор своїм дослідженням зробив істотний внесок у подальший розвиток новітніх напрямів досліджень у галузі біотехнології рослин, а також у розробку генетичних основ селекції рослин.

Висновки роботи нові, обґрунтовані, логічно впливають з експериментальних даних. Вони викладені у цілому достатньо чітко, лаконічно та ясно.

Зауважень щодо рецензованої дисертаційної роботи, які б негативно впливали на її оцінку, у мене немає. Хочу задати лише одне питання авторові: - Ваша робота дійсно біотехнологічна. Ви розробили нові підходи до ефективного отримання поліплоїдних форм злакової рослини - міскантуса, що далеко не просто. Чому Ви не запатентували Ваші розробки?

Оцінюючи дисертаційну роботу в цілому, слід визнати її як завершене самостійне дослідження, що є актуальним, виконане на сучасному науковому рівні, характеризується новизною і величезною кількістю одержаних експериментальних даних, достовірністю та новизною висновків. За обсягом та рівнем виконаних досліджень, їх викладом, отриманими практичними результатами, оформленням та ілюстрованістю дисертаційна робота «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимиотичних сполук динітроанілінового ряду» заслуговує позитивної оцінки. Вона відповідає сучасному рівню біологічних, зокрема – біотехнологічних, досліджень і вимогам постанови КМ України від 24 липня 2013 року №657 «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», а її автор — МЕЛЬНИЧУК Олександр Васильович заслуговує на присудження йому пошукового наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія.

Автореферат достатньо повно та адекватно висвітлює зміст дисертації, основні експериментальні дані опубліковано в наукових виданнях у вигляді 12 праць, з них - 7 статей у фахових виданнях і 5 тез та матеріалів доповідей на наукових конференціях.

Зав. відділом генетики клітинних популяцій
Інституту молекулярної біології і генетики НАН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор біол. наук, професор

В.А. Кунах

В.А. Кунах

