

## ВІДГУК

офіційного опонента Стефановської Тетяни Робертівни на дисертаційну роботу Мельничука Олександра Васильовича «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду», поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 — біотехнологія.

Дисертаційна робота «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду» Мельничука О. В. була виконана у ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України».

**Актуальність теми дисертаційної роботи.** Дисертаційна робота присвячена розробці та відпрацюванню ефективного методу отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro* з використанням сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю. Міскантус гігантський є однією з найбільш поширених енергетичних культур. *M. × giganteus* – це стерильний алотриплоїд, і, як наслідок стерильності цього виду, є те, що всі комерційні плантації *M. × giganteus* представлені клонованими рослинами одного генотипу, чим практично унеможлиблюється ведення селекційної роботи з поліпшення цього виду за допомогою традиційних методів. Проблема такої стерильності може бути вирішена шляхом штучної поліплоїдії.

Як відомо, основним інструментом індукції поліплоїдизації є сполуки, котрі безпосередньо взаємодіють з тубуліном, основною білковою складовою мікротрубочок, завдяки чому відбувається де полімеризація останніх, в тому числі і в складі мітотичного веретена, що призводить до порушення або повного блокування поділу клітини. У якості класичного антимітотичного агенту використовують колхіцин. Серед інших речовин з антимітотичною активністю значний інтерес мають похідні динітроаніліну, які на відміну від

колхіцину характеризуються більш високим високим рівнем спорідненості саме до тубуліну рослинного походження та відносно низькою фітотоксичністю. Саме завдяки цій особливості були здійснені ефективні спроби використати такі сполуки динітроанілінового ряду, як оризалін та трифлюралін, для поліплоїдизації рослин, зокрема і міскантусу.

Оскільки поліплоїдизація стерильних триплоїдних форм цієї культури дозволяє отримати гексаплоїдні рослини, здатні продукувати життєздатне насіння, що є вкрай важливим для покращення стану генетичного різноманіття стерильного алотриплоїда *M. × giganteus*, актуальним є удоскогалення технології поліплоїдизації з метою підвищення її ефективності. Це пов'язано з тим, що найчастіше вживані з цією метою динітроанілінові сполуки характеризуються достатньо високим рівнем фітотоксичності. Отже, пошук нових, менш токсичних речовин серед цього класу сполук дозволив би значно покращити ефективність поліплоїдизації не лише міскантусу гігантського, але й інших видів рослин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.** Дисертаційне дослідження Мельничука О. В. було виконано у відділі геноміки та молекулярної біотехнології Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» у рамках цільових комплексних програм наукових досліджень НАН України «Створення високоврожайних поліплоїдних ліній міскантусу як сировини для отримання біоетанолу та характеристика їх продуктивності» (номер держреєстрації 0113U004719, 2013-2017 рр.) та «Створення високоврожайних поліплоїдних ліній міскантусу як сировини для отримання біоетанолу та характеристика їх продуктивності» (номер держреєстрації 0118U004719, 2018-2022 рр.).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дисертаційна робота є самостійно завершеним науковим дослідженням, в якому дисертантом вперше:

- ✓ застосовано критерії оцінки стабільності комплексів похідних динітроаніліну з  $\alpha$ -тубуліном міскантусу гігантського для оцінки можливості використання новосинтезованих сполук цього класу для проведення поліплоїдизації природних триплоїдів міскантусу;
- ✓ встановлено, що відібрані новосинтезовані похідні динітроаніліну можуть бути ефективно використані для поліплоїдизації міскантусу;
- ✓ показано, що відібрані сполуки завдяки високому ступеню спорідненості до  $\alpha$ -тубуліну міскантусу мають істотно нижчий рівень фітотоксичності порівняно з добре відомими динітроанілінами (оризалін та трифлюралін) для поліплоїдизації міскантусу гігантського в умовах *in vitro*;
- ✓ запропоновано ефективну методику отримання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського за допомогою новосинтезованих сполук динітроанілінового ряду з низькою токсичністю, що дозволило автору отримати та охарактеризувати 43 поліплоїдні лінії цього виду рослин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Наукова новизна докторської дисертаційної роботи отримана і обґрунтована за новими результатами комплексних наукових теоретичних та експериментальних досліджень, і сформульована в дисертації таким чином:

- ✓ отримані поліплоїдні лінії рослин міскантусу гігантського, що мають практичну цінність і можуть бути використані у селекційній роботі та подальших наукових дослідженнях;
- ✓ результати даної роботи вказують на перспективність поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням відібраних новосинтезованих речовин динітроанілінового ряду;
- ✓ матеріали та методи дисертаційної роботи представляють інтерес для впровадження в науково-дослідних установах та у

навчальному процесі для опанування спеціальностей біотехнологічного та генетичного напрямку;

- ✓ результати досліджень здобувача можуть бути використані для уточнення таксономічного статусу рослин роду міскантусу в Європі та Північній Америці, де ще дуже мало відомо про ідентичність та взаємозв'язки його видів.

**Повнота викладу основних наукових положень та висновків у опублікованих наукових працях.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них 7 статей та 5 тез у фахових наукових виданнях та збірках матеріалів конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 176 сторінках друкованого тексту. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, узагальнення, висновків, додатків і переліку використаних джерел, що включає 257 найменувань. Дисертація містить 13 таблиць, 21 рисунок, 2 додатки.

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

У розділі «Вступ» обґрунтовано актуальність обраної теми дослідження, чітко сформульовано мету і завдання дослідження, логічно визначено об'єкт і предмет дослідження, наукову новизну і практичне значення отриманих результатів, відмічено особистий внесок дисертанта у виконанні роботи.

У першому розділі «Огляд літератури» наведено загальні відомості про рослини роду міскантусу, розглянута його таксономія, філогенез та географічне поширення, описана варіабельність хромосомних наборів та розмірів геномів серед перспективних представників цього роду. Також акцентовано увагу на походженні *Miscanthus × giganteus* та поліплоїдних *M. sacchariflorus*, наведено відомості щодо анеуплоїдів та наявності В-хромосом. Розглянуто результати досліджень з генотипування представників

цього роду, проаналізовано відомості щодо популяційної генетики та генетичного різноманіття роду. Висвітлено питання зв'язку генотипу з фенотипом, QTL картування та порівняльної геноміки для роду міскантус. Описано основні особливості міскантусу як перспективної енергетичної культури, вплив різних фракцій лігніну на ефективність оцукрювання у різних видів міскантусу, стабільність складу клітинної стінки та ефективність сахарифікації міскантусу за різних умов середовища та вплив посухи на ріст та якість міскантусу для виробництва біопалива. Проведено оцінку якості біомаси міскантусу як вихідної сировини для перетворення у різні біоенергетичні продукти. Також представлено сучасні досягнення та ключові проблеми у створенні поліплоїдних форм роду міскантус, висвітлено питання методів поліплоїдизації рослин, антимітотичних речовин для штучної індукції поліплоїдії та результати з отримання штучних поліплоїдів міскантусу.

Розділ «*Матеріали і методи досліджень*» складається з трьох підрозділів та містить відомості про основні методи, які було використано при виконанні роботи, а саме методи *in silico* для проведення біоінформатичного пошуку, методу культури тканин і органів рослин *in vitro*, цитологічні методи для вивчення отриманих ліній, біохімічні та інші методи.

Результати роботи висвітлені в трьох об'ємних розділах 5, 6 та 7.

Розділ 5 «Структурно-біологічна оцінка взаємодії динітроанілінів з  $\alpha$ -тубуліном міскантусу» складається з трьох підрозділів. У підрозділі 5.1 наведено результати вивчення за допомогою методу множинного вирівнювання відібраних послідовностей  $\alpha$ -тубуліну. Підрозділи 5.2 та 5.3 містять результати молекулярного докінгу похідних динітроаніліну з  $\alpha$ -тубуліном міскантусу, які вказують на те, що досліджені ліганди здатні утворювати комплекси з  $\alpha$ -тубуліном і потенційний сайт їх зв'язування знаходиться на поверхні білкової глобули. Також за рівнем спорідненості 83 досліджуваних динітроанілінів до  $\alpha$ -тубуліну за критерієм стабільності

комплексів та рівнем фітотоксичності автором відібрано 6 перспективних сполук для подальшого використання у дослідях з поліплоїдизації міскантусу гігантського.

Розділ 6 «Введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro* та отримання його поліплоїдних ліній за допомогою динітроанілінів» включає 4 підрозділи. Підрозділ 6.1 містить результати введення міскантусу гігантського в культуру *in vitro*. В цьому розділі наведено результати експериментів з підбору ефективного методу поверхневої стерилізації ризом міскантусу гігантського. Розроблено метод, що дозволяє отримати 82,2% стерильних експлантів. Підрозділ 6.2 присвячений розробці технології поліплоїдизації міскантусу гігантського з використанням динітроанілінів. містить результати експериментів з визначення оптимальної комбінації регуляторів росту для індукції калюсогенезу міскантусу. Далі в цьому підрозділі обгрунтовано підбір методів поліплоїдизації міскантусу шляхом як непрямого, так і прямого морфогенезу на середовищах, які містили антимітотичні речовини. Підрозділ 6.3 містить результати оцінки виживання отриманих ліній міскантусу гігантського. Автором 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. У наступному підрозділі 6.4 показано, що всі антимітотичні речовини динітроанілінового ряду, які було використано в роботі, індукували поліплоїдію *M. × giganteus*, та за результатами цитологічних досліджень відібрано 43 поліплоїдні лінії. Поліплоїдні лінії мали 114 хромосом, що є властивим для гексаплоїдів *M. × giganteus* ( $2n=114$ ), також спостерігались анеуплоїдні форми міскантусу гігантського. Автором показано, що тестовані динітроаніліни, так само як і референтні, здатні індукувати поліплоїдію *M. × giganteus*, але не мають

високого фітотоксичного впливу на рослини, що істотно позначається на виживанні та мікроклональному розмноженні експлантів.

Розділ 7 «Фенотипова характеристика поліплоїдних форм міскантусу та їх продуктивність» присвячений фенотиповій і біохімічній характеристиці поліплоїдних форм міскантусу та включає 5 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. В цьому підрозділі показано, що деякі поліплоїдні лінії міскантусу гігантського значно перевищували триплоїдний контроль за вивченими показниками. У підрозділі 7.2 наведено результати вивчення накопичення надземної біомаси та співвідношенням стебло/листя за вагою. Підрозділ 7.3 містить результати біохімічної характеристики отриманих поліплоїдних рослин, тут показано, що вміст сухої речовини для всіх проаналізованих ліній міскантусу був нижчим ніж у контролі. Результати визначення вмісту загальних цукрів та моноцукрів в зразках отриманих поліплоїдних ліній міскантусу, наведені в підрозділі 7.4, показали майже однаковий їх вміст у контролі та отриманих поліплоїдних лініях. Найвищий показник енергетичної цінності мала лінія 202, на рівні 3953 ккал. З підрозділу 7.5 видно, що за розрахунком теоретичного виходу біоетанолу найпродуктивнішою є поліплоїдна лінія 202, яка перевищує показники контролю за виходом етанолу в середньому на 14,2%. Слід підкреслити також, що лише у рослин гексаплоїдної лінії 108 автор спостерігав викидання волотей.

Розділ «Аналіз та узагальнення результатів дослідження» лаконічно підсумовує та узагальнює основні результати, отримані в роботі. Зроблені висновки обґрунтовані достатнім об'ємом біотехнологічних досліджень, відображають головні досягнення проведеної роботи та перспективи використання отриманих результатів.

Наукові положення дисертації, її висновки є цілком обґрунтованими, мають значне практичне і теоретичне значення, і відповідають високому науковому рівню роботи. Автореферат за змістом відповідає дисертаційній роботі.

Проте, слід зазначити деякі уточнюючі запитання та незначні зауваження до представленої роботи:

1. У розділі «Огляд літератури» доцільно представити новітні посилання щодо досліджень селекції та генетики міскантусу, наприклад, Farrar K, Heaton, EA, Trindade LM. Editorial., 2018. Optimizing Miscanthus for the Sustainable Bioeconomy: From Genes to Products. *Front Plant Sci.* 2018;9:878.. doi:10.3389/fpls.2018.00878.
2. Бажано в цьому розділі проаналізувати та зробити посилання на джерела, в яких висвітлено перспективність вирощування культури для України та для інших країнах, наприклад, Міскантус в Україні : М. В. Роїк та ін. ; – Київ : Ямчинський О. В., 2019. - 255 с. – ISBN 978-617-7804-11-5; Lewandowski I.; Clifton-Brown J.; Kiesel A.; Hastings A.; Iqbal, Y. Miscanthus. In *Perennial Grasses for Bioenergy and Bioproducts*; Alexopoulos, E., Ed.; Academic Press, Elsevier: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 35–59.
3. В тексті дисертації та авторефераті зустрічається два варіанти позначення гібридності міскантусу гігантського. Краще залишити варіант *Miscanthus × giganteus*.
4. Чи має фітотоксичність динітроанілінів відповідати їх ефективності як антимиотичних агентів?
5. Як пояснити, що отримані поліплоїдні лінії мають різні показники за морфометричними параметрами та біохімічними характеристиками, оскільки всі вони отримані з одного генотипу, а отже мають бути ідентичними?



6. Чи використовували отримані анеуплоїдні лінії при проведенні польових досліджень? Якщо так, то лінії мають бути описані за кількістю хромосом.
7. Чи спостерігалось з часом відновлення кількості хромосом до триплоїдного стану у отриманих гексаплоїдних ліній?
8. За результатами роботи спостерігали викидання волотей у поліплоїдних ліній. Чи є наразі отримане насіння з тих ліній?

В цілому наведені недоліки не є принциповими та не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

В дисертаційній роботі представлено і проаналізовано великий обсяг фактичного матеріалу, отриманого автором самостійно в лабораторно-аналітичних та польових досліджень. Робота є самостійним завершеним науковим дослідженням, результати якого відзначаються певною науковою новизною, достатньою обґрунтованістю і представляють практичний інтерес для вирішення актуальних завдань біотехнології та генетики. Результати наукових досліджень Мельничука Олександра Васильовича, пропонують зручний інструмент та відпрацьовану технологію отримання поліплоїдів міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus*) в культурі *in vitro* з використанням сполук динітроанілінового ряду з низькою фітотоксичністю. Кількість проведених наукових досліджень та високий методичний рівень їх виконання, статистична обробка результатів є адекватною базою для обґрунтування висновків цієї дисертаційної роботи.

**Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.** Вважаю, що дисертаційна робота Мельничука Олександра Васильовича на тему «Одержання поліплоїдних ліній міскантусу гігантського (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.) в умовах *in vitro* з використанням антимітотичних сполук динітроанілінового ряду», за актуальністю проблеми, науковою новизною отриманих результатів, можливістю їх практичного використання, коректністю та достовірністю зроблених висновків повністю відповідає

