

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Чумакової Вікторії Володимирівни

«Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*»,

представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.12 – фізіологія рослин

Актуальність теми. Пшениця озима м'яка належить до провідних продовольчих культур в Україні і світовому землеробстві. Критичним періодом у регуляції розвитку пшениці є яровизація, під час якої визначається здатність рослин переходити до генеративного розвитку, а отже формувати врожай. Генетичний контроль яровизації здійснюється за участі системи генів VRN. На сьогодні з'ясовані окремі молекулярні механізми експресії генів цієї системи, які визначають здатність пшениці озимої переходити до генеративного стану. Тим не менш, зв'язок трофічних та фітогормональних факторів з генетичними механізмами регуляції яровизації залишається недостатньо вивченим. Вуглеводи, як трофічні фактори, здатні виконувати функцію сигнальних молекул в експресії генів, задіяних у регуляції росту і розвитку рослин. Подібні функції властиві фітогормонам, зокрема гіберелінам, проте їхня роль у експресії генів VRN остаточно не з'ясована. У сучасній фітофізіології для вивчення закономірностей морфогенезу рослин широко використовується культура *in vitro*. У дослідках із пшеницею м'якою у культурі *in vitro* достатньо глибоко вивчені закономірності морфогенетичних реакцій, розроблені методи вдосконалення одержання регенерантів та інше. Разом з тим, практично не досліджені закономірності ефектів генів VRN на калюсо- та морфогенез у такій культурі, хоча їх вивчення вагомим для поглиблення існуючих уявлень щодо функціонування генетичних систем при порушенні цілісності рослинного організму. Отже, дисертаційна робота В.В. Чумакової присвячена вивченню фітогормональної та трофічної регуляції яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. за умов *in vivo* та *in vitro* є актуальною, поглиблює знання щодо регуляції розвитку пшениці озимої м'якої і біологічної природи озимості рослин в цілому.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота Чумакової В.В. виконувалась на кафедрі фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В.Н. Каразіна в рамках НДР «Дослідження молекулярно-генетичних та фізіолого-біохімічних механізмів яровизаційного та фотоперіодичного контролю онтогенезу рослин *in vivo* та *in vitro*» (№ держреєстрації 0118U002104) та за завданнями грантів Фонду розвитку і модернізації наукового та навчально-наукового обладнання ХНУ імені В.Н. Каразіна «Модернізувати і розробити комплекс наукового-навчального обладнання для програмованого культивування та ідентифікації молекулярних маркерів особливостей росту і розвитку рослин та мікроорганізмів» (шифр

811Н/9-15), «Розробити комплекс науково-навчального обладнання для дослідження фоторецепторних систем регуляції росту і розвитку рослин» шифр (811Н/10-16) та «Розробити комплекс навчально-наукового обладнання для дослідження ефектів екзогенних індукторів спрямованості шляхів морфогенезу *in vitro* *Triticum aestivum* L. та *Glycine max* (L.) Merr.» (шифр 811Н/12-18).

Достовірність і обґрунтованість результатів наукових положень і висновків. Наукові положення та висновки базуються на експериментальних даних. У роботі були використані ізогені за генами *VRN* лінії пшениці м'якої, отримані співробітниками Селекційно-генетичного інституту НААНУ та сорти пшениці озимої, створені співробітниками Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААНУ.

Дисертантом застосовані сучасні методи: молекулярно-біологічні – для визначення алельного стану генів *VRN*, фізіолого-біохімічні – для визначення вмісту розчинних вуглеводів, цитогенетичні і мікроскопічні – для визначення проліферативної активності меристем, вегетаційні дослід, фенологічні спостереження і морфофізіологічні методи – для визначення характеру ростових процесів та темпів розвитку, біотехнологічні – для досліджень в культурі *in vitro*, статистичні – для визначення достовірності одержаних результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показана залежність алельного стану генів *Vrn* від трофічних умов та тривалості яровизаційного процесу. Встановлено стимулюючу дію екзогенної сахарози на мітотичну активність кореневих меристем за яровизаційного впливу. Виявлено вплив контрастних трофічних умов яровизації та праймування гіберелінами на пролонговані ефекти регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої.

Вперше проведений аналіз алельного стану генів *Vrn* у калусній культурі пшениці озимої. Сформульоване положення щодо стабільності системи генів *Vrn* за умов культивування *in vitro*. Встановлено, що за яровизації у калусній культурі озимої пшениці відбуваються інтенсивні морфогенетичні реакції, що значно стимулює процес отримання рослин-регенерантів. Вперше показана можливість оптимізувати фітогормональний склад живильного регенераційного середовища для культивування пшениці м'якої в культурі *in vitro* шляхом додаванням фітогормону ГК₃.

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 пшениці м'якої *Triticum aestivum* L.

Результати роботи використовуються при викладанні нормативного курсу «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів «Системність регуляції онтогенезу рослин», «Прикладна біохімія та біотехнологія рослин» та «Методи

культури *in vitro* вищих рослин» на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів ХНУ імені В. Н. Каразіна, також вони слугували основою курсових, кваліфікаційних робіт бакалаврів та магістрів.

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 агроприйомів регуляції темпів розвитку рослин пшениці озимої. Отримані експериментальні дані та узагальнення мають важливе значення для розуміння механізмів регуляції пластичності онтогенезу рослин пшениці м'якої. Встановлені закономірності стимуляції позитивними температурами та оптимізацією фітогормонального складу поживного середовища морфогенетичних процесів в культурі *in vitro* можуть бути враховані при біотехнологічних дослідженнях пшениці м'якої *Triticum aestivum* L.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення, загальних висновків, списку використаних джерел та 5 додатків. Робота ілюстрована 19 таблицями та 42 рисунками. Список використаних джерел містить 217 найменувань, з них 78 кирилицею та 139 латиницею.

Обсяг і повнота опублікованих результатів. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 28 наукових праць, серед яких 6 статей у фахових виданнях України (у т.ч. 1 стаття у виданні, що входить до наукометричної бази Web of Science), 1 стаття у закордонному виданні, 2 статті, які додатково відображають наукові результати дисертації, 19 публікацій апробаційного характеру.

Оцінка мови і стилю тексту дисертації. Текст дисертації викладений українською мовою, аргументовано і чітко, легко сприймається при читанні.

Текст автореферату відображає в стислому вигляді суть дисертаційної роботи, результати дослідів, наукову новизну, практичне значення результатів та висновки.

Обговорення змісту дисертації.

Вступ. Висвітлені основні напрями досліджень механізмів регуляції яровизаційного процесу пшениці м'якої і окреслені ті питання, які доцільно дослідити для поглиблення і розширення існуючих уявлень про ці процеси. На підставі цього обґрунтована актуальність теми досліджень.

Розділ 1. Яровизаційний процес як фактор регуляції програми розвитку озимої м'якої пшениці представляє собою огляд літератури.

Підрозділ 1.1 Яровизація – фізіологічний процес. Проаналізовані літературні дані щодо ролі фізіолого-біохімічних процесів та зовнішніх чинників

у перебігу яровизаційних процесів. Наведені основні гіпотези відносно механізмів яровизації.

Підрозділ 1.2 Генетичний та епігенетичний контроль яровизації *Triticum aestivum* L. Здійснено аналіз сучасних літературних джерел стосовно молекулярно-біологічних, молекулярно-генетичних та епігенетичних механізмів регуляції яровизаційних процесів. Описані роль головних генів VRN (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*) у регуляції яровизації, а також механізми їх експресії. Наведені літературні дані про епігенетичну регуляцію процесу яровизації. За літературними даними наведені схеми термоіндукції цвітіння пшениці, а також генетичної мережі регуляції цвітіння пшениці.

Підрозділ 1.3 Вплив трофічних факторів на процес яровизації. Проаналізована роль трофічних факторів, головним чином вуглеводів, у перебігу яровизаційних процесів. Показано, що трофічні фактори є ваговою умовою забезпечення ходу і завершення яровизації, у здійсненні котрої беруть участь вуглеводи не тільки як трофічні чинники, а і як сигнальні молекули, які задіяні у експресії генів VRN.

Підрозділ 1.4 Фітогормональний контроль яровизаційних змін. Наведений аналіз даних літератури стосовно ролі фітогормонів у регуляції метаболічних та генетичних процесів в ході яровизації. Основна увага сконцентрована на функціях гіберелінів у цих процесах як основних фітогормонах чинників, задіяних у регуляції переходу рослин до генеративного стану. Проаналізовані літературні дані щодо взаємодії гіберелінів з генами контролю флорального морфогенезу за яровизації. Наведена схема гормонального та генетичного контролю цвітіння пшениці м'якої.

Підрозділ 1.5 Культура *in vitro* – модельна система досліджень у біології рослин. Проаналізовані літературні дані щодо закономірностей морфогенетичних процесів у культурі *in vitro*. Показана їх залежність від генотипу рослини-донора експланту, складу живильного середовища, зовнішніх чинників – температури, освітлення та інше. Проаналізовані дані щодо нестабільності геному та геномних змін *in vitro*.

Розділ 1 завершується коротким ємним узагальненням аналізу даних літератури, у якому висвітлені ті питання, які доцільно дослідити для розширення і поглиблення уявлень щодо механізмів регуляції яровизаційного процесу пшениці м'якої як на рівні цілісної рослини, так і у культурі *in vitro*.

Загалом представлений огляд літератури достатньо повно характеризує сучасний стан дослідження процесу яровизації пшениці м'якої. Він спирається на аналіз 227 джерел літератури, серед яких 78 кирилицею та 139 латиницею.

Розділ 2. Матеріали і методи досліджень. Містить детальне описання рослинного матеріалу (підрозділ 2.1), умов досліджень (підрозділ 2.2), схем

дослідів *in vivo* (підрозділ 2.2.1) та *in vitro* (підрозділ 2.2.2), опис методів досліджень (підрозділ 2.3), у якому наведене описання молекулярно-біологічних методів (підрозділ 2.3.1), фізіолого-біохімічних методів (підрозділ 2.3.2), методів культури *in vitro* (підрозділ 2.3.3), та статистичної обробки результатів (підрозділ 2.3.4). Аналіз цього розділу показує, що у роботі застосовані сучасні, адекватні поставленим задачам методи досліджень.

Розділ 3. Молекулярно-біологічний контроль яровизаційного процесу. Наведені результати вивчення алельного стану генів VRN за цими генами у шести ізогенних ліній, а також озимих сортів пшениці Миронівська 808 і Ольвія, у генофоні яких були створені ці лінії.

У підрозділі 3.1 показані виявлені відмінності між лініями за алельним станом генів VRN, які визначають різну тривалість періоду від сходів до колосіння у досліджених ліній ярого типу розвитку.

Встановлена наявність рецесивного алеля *vrn-A1b* у вихідних озимих сортів Миронівська 808 і Ольвія. У ізоліній Vrn 1 і Vrn 3 наявний домінантний алель *Vrn-A1a*, який визначає повну нечутливість до яровизації, а отже ярий тип розвитку. Показано, що домінантний алель *Vrn-A1* представлений одним продуктом ампліфікації – 965п.н. З'ясовано, що домінантний алель *Vrn-A1a* відрізняється від рецесивного *vrn-A1b* делецією розміром 20п.н. Домінантний алель *Vrn-A1a* (750п.н.) присутній у всіх ізоліній. З'ясована наявність продукту ампліфікації 1068п.н. у сортів Миронівська 808 і Ольвія та ізолінії Vrn 2, який характерний для рецесивного алеля *vrn-A1b*.

У локусі *Vrn-B1* виявлені домінантні алелі (709п.н.) у ізоліній Vrn 2 обох сортів. У інших ліній встановлена наявність рецесивного алелю *vrn-B1* (1149п.н.), який визначає сповільнені темпи розвитку ізоліній.

У локусі *Vrn-D1* виявлена присутність тільки одного рецесивного алелю *vrn-D1* (997п.н.) у всьому дослідженому матеріалі, що підтверджує літературні дані.

У цьому підрозділі наведені дані про тривалість періоду сходи-колосіння у ізоліній, які підтвердили, що залежно від генотипу за генами VRN досліджені лінії відрізняються за темпами розвитку.

У підрозділі 3.2 наведені дані щодо залежності алельного стану генів VRN від трофічних умов яровизації. На моделі яровизації за схемою: 1) цілі зернівки з ендоспермом (оптимальне трофічне забезпечення); 2) ізолювані зародки на воді (відсутність трофічного забезпечення); 3) ізолювані зародки на 3%-ному розчині сахарози показано, що протягом 15 і 30 діб яровизації у алельному стані генів VRN не відбувалися зміни залежно від трофічного забезпечення. Після 45 діб яровизації і в умовах оптимального та штучного трофічного забезпечення та тільки в локусі *Vrn-B1* – головного репресора цвітіння – відбувалися зміни –

ідентифікувалися як рецесивні алелі *vrn-B1* (1149п.н.), так і домінантні – *Vrn-B1* (709п.н.). За відсутності трофічного забезпечення подібних змін не виявлено.

У підрозділі 3.3 викладені результати вивчення алельного стану локусів генів VRN в умовах культури *in vitro*. Показано, що інтенсивність морфогенетичних процесів у ізоліній залежить від генотипу за генами VRN. За інтенсивністю калюсогенезу лінії ранжовані: *Vrn2* > сорт > *Vrn1* > *Vrn3*. Це свідчить про участь генів VRN у контролі процесів морфогенезу у культурі *in vitro*.

Визначення алельного стану генів VRN у культурі *in vitro* показало незначні зміни тільки у лінії *Vrn 3* сорту Миронівська 808 у алельному стані гена *Vrn-B1*. Порівняння стану цього гену у зернівках (*in vivo*) зі станом у калюсах показало відсутність у *in vitro* компоненту *VRN-B1 / vrn-B1*. Припускається, що у культурі *in vitro* практично не змінюється стан генів VRN, а відтак, ця культура є адекватною моделлю для дослідження фізіолого-біохімічних процесів залежно від генотипу пшениці м'якої за генами VRN.

Розділ 4. Вплив контрастних трофічних умов яровизації на ріст та розвиток сортів озимої м'якої пшениці. У дослідях цього розділу використані сорти озимої пшениці Статна, Досконала і Дорідна. Між ними виявлена різниця за рівнем прояву досліджуваних ефектів, які автор пояснює генотиповими особливостями сортів.

У підрозділі 4.1 містяться результати вивчення рівня трофічного забезпечення яровизації на мітотичну активність меристем. Показано, що інтенсивність поділу клітин кореневої меристеми за яровизації стимулювалася при оптимальному трофічному забезпеченні (цілі зернівки) та при штучному забезпеченні (ізолювані зародки + 3%-ний розчин сахарози), в той час як надмірне трофічне забезпечення (цілі зернівки+3%-ний розчин сахарози) та відсутність трофічного забезпечення (ізолювані зародки+ вода) інгібували цей процес.

У підрозділі 4.2 викладені результати вивчення впливу рівня трофічного забезпечення на динаміку вмісту розчинних вуглеводів у проростках за яровизації. Показано, що за оптимального, надлишкового і недостатнього трофічного забезпечення динаміка вмісту розчинних вуглеводів змінюється, а при його відсутності подібні зміни або не відбуваються, або проявляються тільки на рівні незначних тенденцій.

У підрозділі 4.3 описані результати зміни ростових процесів у проростках залежно від рівня трофічного забезпечення за яровизації. Наведені також дані про темпи розвитку рослин, вирощених з яровизованих проростків за різного трофічного забезпечення. Показано, що лінійний ріст надземної частини і коренів як за надлишку (зернівки + сахароза), так і за нестачі (ізолювані зародки + вода)

трофічного забезпечення інгібувався, порівняно до росту за оптимального тропічного забезпечення (зернівки + вода). Динаміка накопичення структурної біомаси проростками протягом яровизації також залежала від рівня тропічного забезпечення яровизаційних процесів.

Показано, що темпи розвитку рослин пшениці озимої, вирощених з яровизованих проростків, розрізнялися залежно від умов тропічного забезпечення при яровизації. Найшвидше переходили до колосіння рослини, вирощені з проростків, яровизованих за оптимального тропічного забезпечення, повільніше – вирощені з яровизованих зародків з додаванням сахарози, а найбільш повільно ті рослини, які були вирощені із зародків, яровизованих на воді.

Розділ 5. Фітогормональна регуляція яровизаційного процесу. У розділі наведені результати вивчення ролі праймування гібереліном у регуляції ростових процесів, динаміки вмісту вуглеводів та темпів розвитку рослин.

У підрозділі 5.1 описані результати вивчення впливу праймування гібереліном на ростові процеси (лінійний ріст надземної частини і коренів та накопичення біомаси), а також на вміст розчинних вуглеводів у проростках на фоні різного тропічного забезпечення яровизації у сортів озимої пшениці Дорідна, Статна і Альянс. Встановлено стимулюючу дію гібереліну на ці процеси у варіантах зернівки + ГК та зародки + ГК, порівняно до відповідних контролів – зернівки + вода і зародки + вода.

Показано також, що праймування гібереліном у процесі яровизації стимулює накопичення водорозчинних вуглеводів у проростках у варіантах зернівки + ГК і зародки + ГК, чого не відбувається без праймування.

У розділі 5.2 наведені результати вивчення впливу праймування гіберелінами на фоні різного тропічного забезпечення яровизації на темпи розвитку рослин, вирощених з яровизованих проростків. Встановлено, що праймування гібереліном у варіанті зернівки + ГК прискорювало перехід до колосіння сортів Статна і Альянс, але сповільнювало його у сорту Дорідна. Автор пояснює ці відмінності між сортами особливостями їх генотипу.

Розділ 6. Дослідження яровизаційного процесу в системі культури *in vitro*. У цьому розділі наведені результати, одержані з сортами пшениці озимої Дорідна, Статна і Астет. Встановлені генотипові їх особливості відносно прояву реакції на фактори впливу у дослідках.

У підрозділі 6.1 показано, що за дії пониженої температури (+4°C) протягом 45-ти діб у культурі *in vitro* досліджених сортів пшениці озимої відбуваються морфогенетичні процеси – хлорофілогенез, гемогенез та ризогенез. Їх інтенсивність за дії пониженої температури була більш високою, ніж у контролі – при температурі 26°C. Тобто, у культурі *in vitro*, подібно тому як і в культурі *in*

vivo можуть відбуватися яровизаційні процеси, які вірогідно, пов'язані з розвитком рослин.

У підрозділі 6.2 викладені результати вивчення впливу гібереліну у складі живильного середовища на процеси калюсогенезу, гемогенезу, хлорофілогенезу та ризогенезу у сорту пшениці озимої Астет. Встановлено, що гіберелін у концентрації 0,1 і 0,5 мг/л стимулював морфогенез. Оскільки концентрація інших гормонів (НОК і БАП) у живильному середовищі була постійною, то факт стимуляції гібереліном морфогенетичних процесів у калюсній культурі пояснюється саме його впливом. Вказано, що гіберелін поряд з іншими фітогормонами може бути застосований у культурі *in vitro* пшениці озимої для регуляції морфогенезу.

Всі розділи дисертації містять короткі узагальнення та висновки.

Узагальнення. У ньому, спираючись на власні та літературні дані автор роботи обґрунтовує положення про те, що регуляція яровизаційного процесу здійснюється у взаємодії фітогормональних, і трофічних факторів з контролем яровизації системою генів VRN.

Висновки, сформульовані автором, в цілому експериментально і теоретично достатньо обґрунтовані і відповідають меті та задачам дослідження.

Зауваження та побажання.

1. У розділі 1 наведений ґрунтовний огляд літератури і зроблене узагальнення. Однак на завершення цього розділу доцільно було б сформулювати робочу гіпотезу. Хоча вона і сформульована у авторефераті як методичний підхід (Розділ Матеріали і методи).

2. У роботі доволі часто зустрічаються не достатньо коректні висловлювання, орфографічні та стилістичні помилки, русизми та технічні помилки.

3. Окремі рисунки оформлені не досить чітко. Зокрема рисунки 3.1, 3.2, 3.3 (стор. 75,76,77) та 3.9 названі «Виявлення алелів ...». Виявлення це процес, а рисунок – це результат виявлення.

4. На рисунку 3.1 доцільно було б вказати стрілками ті продукти ампліфікації, які були виявлені, подібно тому, як це зроблено на інших рисунках.

5. Доцільно було б пояснити чому вміст олігоцукрів у проростках за яровизації значно перевищує вміст моноцукрів незалежно від варіанту досліду (підрозділ 4.2).

6. Рисунок 4.16 (стор.117) не ілюструє різниці за темпами розвитку рослин пшениці озимої, вирощених з яровизованих проростків за різного трофічного забезпечення, бо на ньому не видно колосся.

7. Є потреба у поясненні причин того, що виявлений більш високий вміст моно- і олігоцукрів у проростках у варіанті яровизації зародків, праймованих

гібереліном, порівняно до контролю – зародки не праймовані гібереліном (рис. 5.2 і 5.3, стор. 124,125).

8. Позначення на рисунках 6.2,6.3, 6.4 варіантів Т і Х з розшифровкою Т – контроль $t = 26^{\circ}\text{C}$ і Х – холод $t = +4^{\circ}\text{C}$ не сприяє зручності розуміння рисунків.

9. Доцільно було б пояснити чому у різних дослідах використані не одні й ті ж сорти пшениці озимої.

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. Аналіз дисертаційної роботи Чумакової В.В. показує, що у цілому вона є завершеним науковим дослідженням, яке містить вирішення наукового завдання – з'ясування окремих вагомих аспектів механізмів трофічної та фітогормональної регуляції яровизаційного процесу пшениці озимої м'якої за умов *in vivo* та *in vitro*. Для досягнення мети і вирішення задач дослідження автором використано комплекс сучасних адекватних методів.

Вважаю, що робота «Фітогормональна та трофічна регуляція яровизаційного процесу озимої м'якої пшениці *in vivo* та *in vitro*» за актуальністю, обсягом виконаних досліджень, науковою новизною, 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,

завідувач відділу фітогормонології

Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ



І.В. Косаківська

