

ВІДГУК

офіційного опонента

**на дисертаційну роботу ПРИСТАЛОВА Антона Ігоровича
«ВПЛИВ СКЛАДУ КРІОЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА МЕТОДІВ
ОХОЛОДЖЕННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ГЕРМПЛАЗМИ
ВИНОГРАДУ»,**

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
зі спеціальності 03.00.19 – кріобіологія

Збереження та ефективне використання генетичного різноманіття рослин є необхідним елементом продовольчої, екологічної і соціальної безпеки держави та розвитку різних сфер діяльності людини. Повною мірою це стосується і генофонду винограду. За оцінками фахівців, існує реальна загроза втрати значної кількості сортів в зв'язку зі зникненням у багатьох регіонах світу дикорослого винограду, зменшенням кількості сортів в промислових насадженнях, реконструкцією насаджень тощо. Більшість аборигенних і малопоширених сортів винограду нині збережена лише завдяки колекціям. За умов розвитку біотехнології зросла цінність зародкової плазми як вихідного матеріалу для селекції винограду. При цьому ефективним способом вирішення проблеми збереження генетичних ресурсів рослин, який зменшує ризик їх втрат через хвороби і вплив абіотичних стресорів, є кріоконсервація. Цей спосіб став основним для збереження генетичного матеріалу зернових, а також деяких плодових і ягідних культур у розвинених країнах світу.

Розробка методів кріоконсервації виноградної лози почалася у 90-х роках минулого століття. Основним механізмом збереження біологічних об'єктів в умови наднизьких температур (до -196°C) є вітрифікація. Однак кріоконсервація гермоплазми винограду ще не набула належного розвитку через технічні труднощі, зумовлені особливостями будови клітин (великі розмірами клітини, сильна вакуолізація, а отже, великий вміст води). Істотна дегідратація призводить до необоротної втрати життєздатності клітин. Додаткові складнощі зумовлені неоднорідністю морфології і хімічного складу тканин бруньок. Перспективним вважається кріозбереження бруньок і живців різних видів цінних рослин, що перебувають у стані спокою. Проте дотепер системних досліджень стосовно кріоконсервування прищепних частин винограду (бруньки, живці) не було. Зважаючи на це, дисертаційна робота А.І. Присталова, метою якої було створення ефективних методів насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами для підвищення їх збереженості при низькотемпературному або гіпотермічному зберіганні, є дуже актуальною.

Завдання, які виконувалися в рамках дослідження, логічно підпорядковані меті. Основними з них були: розробка ефективних способів насичення і відмивання живців і бруньок винограду живильними та кріозахисними середовищами; вивчення впливу різних способів дегідратації гермплазми винограду на її життєздатність; дослідження низькотемпературних фазових переходів у бруньках винограду; оцінка збереженості бруньок винограду після кріоконсервування із застосуванням розроблених методичних підходів порівняно з насиченням їх кріопротекторами та відмиванням.

Дисертаційна робота виконувалася в рамках тематики лабораторії фітокріобіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Робота написана українською мовою і викладена на 164 сторінках. Вона складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 4 розділів з результатами власних досліджень, узагальнення, висновків, списку використаних джерел і 5 додатків.

Перший підрозділ огляду літератури присвячений загальним питанням збереження генофонду рослин і значенню кріоконсервування у зберіганні колекційних зразків. Окремо розглядаються підходи до зберігання генофонду винограду. При цьому питанням гіпотермічного зберігання генетичних ресурсів винограду присвячено окремий підрозділ. Дисертант відзначає, що при зберіганні та заготівлі матеріалу необхідно підтримувати необхідний рівень вологості досліджуваних об'єктів, що в практиці виноградарства реалізується методом вимочування, який дозволяє стимулювати живці та підняти вологість до потрібного рівня. Проте цей підхід має низку істотних недоліків, зокрема, спричиняє гіпоксію бруньок, вимивання розчинних вуглеводів, підвищує ймовірність інфікування. Зважаючи на це, розробка способів збереження нативної вологості живців, захист зрізів від проникнення в них інфекції є важливими засобами в отриманні оздоровлених саджанців.

У наступному підрозділі огляду детально описуються підходи до кріозберігання генетичних ресурсів рослин. Йдеться про метод заморожування і зберігання рослинного матеріалу при наднизьких температурах (-196°C), що є основою можливості необмежено довгого зберігання генофонду рослин. Окремо аналізуються наявні дані про кріоконсервування гермплазми винограду. Автор відзначає, що зберігання генетичних ресурсів винограду можливе як у польових колекціях *in vivo*, так і *in vitro* у гіпотермічних умовах або в умовах низькотемпературних банків. При цьому ефективних методів кріоконсервування бруньок винограду на

момент виконання роботи розроблено не було, що і зумовило доцільність виконання даної роботи.

У розділі 2 описано матеріали та методи дослідження. Цей розділ починається описом ґрунтових умов на місці закладання ампелографічної колекції на дослідній ділянці при ІПКіК НАН України. Далі наводиться перелік сортів винограду та характеристика їх основних ознак. Також описано склад досліджуваних кріоконсервуючих розчинів PVS (plant vitrification solution). Окремий підрозділ присвячений опису конкретних методів, зокрема, методу насичення живців винограду різними середовищами із застосуванням вакуумної інфільтрації і відповідної установки та застосованих автором технічних прийомів з оптимізації методу. В окремих пунктах детально описано підходи до визначення кінетики насичення живців винограду розчинами різної в'язкості методом вакуумної інфільтрації, оцінки життєздатності бруньок у складі живця винограду, вивчення впливу розчинів сахарози на життєздатність і терміни проростання бруньок винограду. Окремо описано застосування методу низькотемпературної диференційної сканувальної калориметрії, методи насичення ізольованих бруньок винограду вітрифікуючими розчинами PVS, методи відмивання від кріозахисних середовищ, контролю зміни температурних умов. Наприкінці розділу вказано способи статистичної обробки результатів.

Розділ 3, перший серед експериментальних, має назву «Створення ампелографічних колекцій в умовах дослідних ділянок». У ньому описано проведену роботу з інтродукції 65 південних сортів на дослідній ділянці Біологічної станції ХНУ ім. В.Н. Каразіна та 75 сортів винограду на території ІПКіК НАН України. Відзначається, що сорти винограду, які вирощуються на дослідних ділянках, мають різні генетично детерміновані ознаки (високу продуктивність, морозостійкість, резистентність до хвороб тощо). Також колекції містять новітні високо гетерозиготні гібриди. Це дало дисертанту можливість одержувати та контролювати власний дослідний матеріал упродовж всього вегетаційного періоду.

Наступний розділ присвячений визначенню ефективності методів насичення живців винограду. Для гіпотермічного зберігання вегетативних частин рослин важливими є витримування певного рівня вологості, запобігання забрудненню і зараженню. Для поліпшення тривалості зберігання часто буває необхідна попередня обробка, зокрема, насичення тканин живильним середовищем і кріопротекторами. У роботі для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури живильними та кріозахисними середовищами дисертантом розроблено і запатентовано спосіб із застосуванням вакуум-інфільтрації. Оцінка можливого пошкодження живців винограду методом вакуум-інфільтрації показала, що

життєздатність бруньок за тестом культивування не змінювалася порівняно з контролем. При цьому бруньки на інфільтрованих живцях розвивалися на 2–4 дні раніше від контрольних. За даними автора, метод вакуум-інфільтрації дозволяє ефективно наситити живці у короткі терміни.

На наступному етапі роботи було визначено мінімально допустиму межу зневоднення живців винограду. Показано, що підтримання вологості живців на рівні 40-52% не приводить до істотного зниження життєздатності живців у процесі гіпотермічного зберігання.

За оцінкою дисертанта, найбільш перспективним способом зберігання матеріалу може бути використання живців з парафінованими зрізами із застосуванням методу вакуум-інфільтрації. При зниженні вологості досліджуваних зразків до 47-48% у процесі зберігання, методом вакуум-інфільтрації вдавалося відновити рівень вологості до нативної величини. В цілому, результати досліджень дозволили дисертанту рекомендувати метод вакуум-інфільтрації для прискороного насичення прищепної частини стимулюючими середовищами; для скорочення часу насичення і видалення середовища за рахунок витіснення іншим середовищем з об'єктів, які мають трубчасто-капілярну структуру; для відновлення початкової вологості живців у процесі зберігання. Це дозволяє виключити стадію вимочування живців, а отже і знизити ймовірність перенесення вірусних інфекцій від хворих живців на здорові.

У розділі 5 наводяться результати дослідження впливу сахарози на гермплазму винограду в умовах дегідратації. Автором визначено діапазон оптимальних концентрацій сахарози для насичення сплячих бруньок винограду, який становить 0,1-0,7 М. Досліджено життєздатність бруньок на живцях винограду і терміни їх пророщування після насичення розчинами сахарози у різних концентраціях з різним часом експозиції в розчинах тієї ж концентрації методом вакуум-інфільтрації. Показано підвищення життєздатності бруньок за вологості живців 40,5% за насичення 0,5 і 0,7 М сахарозою.

Розділ 6 присвячений удосконаленню методів кріоконсервування ізольованих сплячих бруньок винограду. Одним з результатів цієї частини роботи стало удосконалення методу вакуум-інфільтрації шляхом додавання етапу дегазації, збільшенням часу інкубації до 15-20 хв, зниженням тиску до 35-40 кПа та повільнішим підвищенням тиску до атмосферного, що дозволило більш ефективно насичувати ізольовані бруньки винограду.

Дисертант також дослідив низькотемпературні фазові переходи у PVS (розчинах для вітрифікації рослин). Завдяки високій концентрації кріозахисних речовин в їх складі, при високих швидкостях охолодження розчини PVS не кристалізуються, а при досягненні певної температури

переходять в твердо-аморфний стан. Однак відсутність кристалізації на етапі охолодження не виключає її розвитку при нагріванні вище температури «склування». Автором були досліджені фазові переходи і склування кріозахисних розчинів найбільш перспективних для кріоконсервування бруньок винограду: PVS1, PVS2, PVS3, PVS4 і PVS N. Показано, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 мають вищу здатність до склування та стабільність аморфної фази порівняно з PVS4 і PVS N. PVS2 має високу склоутворюючу здатність навіть у 80% концентрації, що, за оцінками автора, робить його більш перспективним при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

Також у роботі порівняно ефективність методу вакуум-інфільтрації і пасивного інкубування для насичення середовищами PVS бруньок винограду. Показано, що створення зниженого тиску в тканинах бруньок перед зануренням у кріозахисний розчин призводить до кращого проникнення захисних речовин у тканини бруньок порівняно з традиційним методом насичення і потребує менше часу для ефективного насичення. Метод VIV (*vacuum infiltration vitrification*) дозволяє знизити в кілька разів час інкубації бруньок винограду у кріозахисному розчині, а отже можливу токсичну дію розчинів порівняно з пасивним насиченням, а також забезпечує більш ефективне насичення бруньок захисними речовинами. Автором зроблено висновок, що використання методу VIV дозволяє підвищити збереженість та життєздатність ізолюваних бруньок винограду при кріоконсервуванні порівняно зі стандартним методом насичення. Застосування методу VIV кріоконсервування може стати основою високопродуктивної технології для збереження *ex situ* генетичних ресурсів рослин.

Таким чином автором розроблено нові способи насичення живців та ізолюваних бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами та доведено їх ефективність у протоколах кріоконсервування і гіпотермічного зберігання гермплазми винограду. Зокрема, вперше розроблено спосіб насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури методом вакуум-інфільтрації і доведена його ефективність. Визначено оптимальні величини тиску, необхідного для насичення живців винограду із відкритими зрізами.

Важливим результатом є доведення можливості ефективного насичення ізолюваних бруньок винограду методом вакуум-інфільтрації без втрати їх життєздатності та визначено умови якісного насичування бруньок розчинами PVS для подальшого кріоконсервування методом вітрифікації. **Рівень обґрунтованості основних наукових положень, висновків і рекомендацій в дисертації є цілком задовільним.**

Вірогідність результатів дисертаційних досліджень підтверджена використанням методів статистичної обробки. **Загалом, є підстави оцінювати результати, викладені у роботі, як вірогідні, а наукові положення і висновки як достатньо нові і обґрунтовані.**

Практичне значення роботи полягає, зокрема, у розробленні способу вакуум-інфільтрації живців плодово-ягідних культур, який передбачає застосування зниженого тиску для проходження рідини вздовж живців, що насичуються. Також розроблено спосіб відмивання живців від кріозахисних середовищ із застосуванням підвищеного тиску, який може бути використано як в лабораторних, так і в польових умовах. Загалом, значення новітніх підходів для кріозберігання живців і бруньок винограду підтверджено п'ятьма патентами на корисну модель. На підставі отриманих результатів може бути розроблений комплекс прийомів для подальшої оптимізації способів кріоконсервування бруньок винограду.

Автореферат відображає основний зміст дисертації. За результатами роботи опубліковано три статті, оформлено 5 патентів України на корисну модель. Також опубліковано 13 матеріалів і тез доповідей, робота була представлена на наукових конференціях і симпозіумах як в Україні, так і за її межами. **Викладення основних положень дисертації в опублікованих працях та авторефераті є достатньо повним.**

При прочитанні дисертаційної роботи виникають окремі питання і зауваження.

1. Розділ 2 (методичний) починається з опису особливостей ґрунту на місці передбачуваних виноградників поблизу с. Гайдари Зміївського району та на території ІПКіК НАН України. Цей опис виходить за межі основної тематики дисертації і його варто було б перенести в додатки, так само не доречні в основній частині дисертації суто ілюстративні фото (рис. 2.1.1 і 2.1.2). є зайвими рис. 2.2.3, 2.2.14.1.
2. Ознаки сортів виногради, вибраних для досліджень, наведені у табл. 2.1.1. При цьому відсутнє посилання на джерело, з якого взято характеристику сортів.
3. На с. 48-49 описаний склад розчинів PVS. При цьому залишається незрозумілим, чи розроблений він дисертантом (якщо так, то за якими критеріями), чи запозичений. Посилання [167] з'ясувати це питання не дозволяє, у даній роботі склад розчинів PVS не описаний.
4. Важко назвати вдалим опис методу охолодження та відігрівання бруньок винограду (с. 60). Зокрема, навряд чи можна вважати коректною фразу про «занурення [контейнерів] у рідкий азот зі швидкістю 150-200°C».

5. Розділ 3 основної теми стосується опосередковано, він перевантажений ілюстративними фото. Водночас слід зауважити, що у цьому тексті бракує посилань на джерела літератури стосовно вибору дизайну виноградикив.
6. При аналізі результатів із застосування нових і модифікованих кріокосервування живців і бруньок винограду бракує біологічної інтерпретації отриманих результатів щодо впливу кріопротекторів та зневоднення на виживаність об'єктів. Біологічні механізми явищ майже не обговорюються і дані літератури для інтерпретації отриманих власних результатів не залучаються. Водночас варто відзначити, що автором глибоко проаналізовано фізичну складову досліджуваних ефектів.

В цілому ж, вказані недоліки не зменшують позитивної оцінки роботи.

Отже, дисертаційна робота «Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду» відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукового ступеня», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 576 від 24 липня 2013 року, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор **Пристапов Антон Ігорович** заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Офіційний опонент
доктор біол. наук, професор,
зав. кафедри ботаніки і фізіології рослин
Харківського національного аграрного
університету ім. В.В. Докучаєва



Ю.Є. Колупаєв



Ю.Є. Колупаєв засвідчується
Керівник відділу діловодства і канцелярії

Т. Маршала
20 14 р.