

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Присталова Антона Ігоровича** «Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду», поданої до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.19 – кріобіологія

Детальний аналіз дисертації **Присталова Антона Ігоровича** «Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду» дозволяє сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості основних наукових положень, наукової новизни, достовірності висновків, рекомендацій, практичного значення, а також загальної оцінки роботи.

В "Анотації" наведено основні наукові положення дисертації та список 21 публікації за її темою.

Актуальність теми. Проблема довгострокового збереження генофонду рослин є виключно актуальною з точок зору забезпечення продовольчої безпеки населення, необхідності покращення якості життя людей, протидії генетичній ерозії, а для України також підвищення конкурентоздатності вітчизняної фундаментальної та прикладної науки, селекції та агропромислового виробництва. Для культурних рослин, що репродукуються вегетативно, основним способом зберігання зразків генофонду є «польові генбанки» – колекційні насадження, які з одного боку не забезпечують надійного захисту рослин від негативних природних, техногенних, антропогенних чинників, а з другого боку потребують значних капітальних і поточних витрат. Ефективним шляхом вирішення цієї проблеми, зокрема для винограду, є кріоконсервування вегетативних частин рослин зразків генофонду. Разом з цим, ефективна технологія кріоконсервування прищепних частин винограду (бруньки, живці) на даний час практично не розроблена. Зокрема, стосовно різних груп сортів не встановлені параметри підсушування, вітрифікації, введення у стан кріопрезервації та виводу з нього; існуючі способи режими обробки не забезпечують швидкого проникнення кріозахисних речовин у тканини рослин. Все це обумовлює актуальність дослідження А.І. Присталова, присвяченого вирішенню означеного комплексу проблем.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках відомчих НДР лабораторії фітокріобіології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) № 2.2.6.106 «Розробка теоретично – обґрунтованих підходів до кріоконсервування рослинних об'єктів різного рівня організації»

(№ державної реєстрації 0116U003496), де автор самостійно виконував окремі розділи як відповідальний виконавець.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків, рекомендацій та їх достовірність. Присталовим А.І. чітко сформульовано мету і задачі досліджень, що стало основою для обґрунтування напрямів дослідів. Вивчено і проаналізовано теоретичні положення і наукові розробки інших авторів з усього комплексу збереження генетичних ресурсів винограду і, зокрема, кріоконсервування цієї культури та інших плодових і ягідних культур. Було опрацьовано 185 вітчизняних і закордонних літературних джерел.

Наукові положення, висновки, рекомендації для практики, сформульовані в дисертаційній роботі, ґрунтуються на узагальнених результатах власних експериментальних досліджень автора відповідно до загальноприйнятих та розроблених і запатентованих автором методик з використанням сучасних способів оцінки матеріалу. Аналіз даних на основі математично-статистичного методу підтвердив достовірність одержаних результатів, що дало можливість зробити аргументовані і логічні висновки та пропозиції для практики.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у відмінності результатів досліджень від відомих раніше, оскільки вперше на території Слобожанщини створено дві ампелографічні колекції державної власності при ІПКіК НАН України; розроблено нові способи насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами, що є важливим для ефективного польового, низькотемпературного і гіпотермічного зберігання генетичних ресурсів винограду. Дослідження відрізняються від проведених раніше застосуванням методу вакуум-інфільтрації для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури і доведенням його ефективності, зокрема для прискорення насичення прищепної частини винограду стимулюючими середовищами що дозволяє виключити стадію вимочування живців і знизити можливість перенесення вірусних інфекцій; визначенням оптимальних параметрів тиску необхідного для насичення живців винограду з відкритими зрізами. Уперше проаналізовано вплив вакуум-інфільтрації для відновлення початкової вологості в живцях винограду в умовах холодильної камери на зміну їх рівня вологості і життєздатності при тривалому гіпотермічному зберіганні, визначено кількісні значення оптимальних концентрацій сахарози для насичення сплячих бруньок винограду цим методом та досліджено життєздатність бруньок і терміни їх пророщування залежно від ступеня вологості та часу насичення. Уперше досліджено фазовий стан в інтервалі температур від $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ до повного плавлення у бруньках винограду, які були насичені кріозахисними середовищами групи PVS різними методами. Доведено можливість ефективного насичення ізольованих бруньок винограду

методом вакуум-інфільтрації без втрати їх життєздатності та визначено умови якісного насичування бруньок розчинами PVS для подальшого кріоконсервування методом вітрифікації.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи розширюють можливості тривалого збереження життєздатності зразків генофонду винограду з забезпеченням їх генетичної стабільності, запобігання ризику пошкодження і загибелі під дією несприятливих чинників у лабораторних та польових умовах. Використання отриманих у роботі даних можливо у галузі біотехнологій виноградарства, оскільки робота з живцями і бруньками не вимагає стерильності, і після деконсервування такий матеріал можна легко використовувати за допомогою щеплень. Для підвищення ефективності кріоконсервації, низькотемпературного та гіпотермічного збереження вегетативних частин рослин винограду цінними є розробки автора: застосування зниженого тиску для проходження рідини вздовж живців, що насичуються (патент України №85644); удосконалений спосіб насичення живців (патент України №121556), який дозволяє водночас насичувати живильним або кріозахисним середовищем необхідну кількість живців; спосіб відмивання живців від кріозахисних середовищ із застосуванням підвищеного тиску (патент України №136543). Одержані в роботі дані про фазовий стан розчинів PVS можуть бути використані під час розробки методичних підходів кріоконсервування інших видів рослин. Створена ампелографічна колекція є матеріалом для фундаментальних і прикладних досліджень, а також, у перспективі, може бути основою для відродження виноградарства у східному лісостепу України. Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в учбовому процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, та сільськогосподарських наук.

Особистий внесок здобувача полягає в отриманні експериментальних даних у всіх розділах досліджень, результати яких представлено в роботі; самостійно проведених статистичній обробці, аналізі, інтерпретації та узагальненні одержаних результатів, формулюванні основних положень і висновків. Автором разом із науковим керівником проведено патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, визначено тему, мету та задачі роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень пройшли апробацію на наукових і науково-практичних форумах різного рівня, які відбулись у містах: Пушино, Росія, 2008; Люблін, Польща, 2017; Харків, Україна, 2017, 2018, 2020; Вінниця, Україна, 2018; Київ, Україна, 2019; Каунас, Литва, 2019; Любек, Німеччина, 2019.

Публікації. Основні положення дисертації викладені у 21 науковій роботі, з них дві статті у фахових виданнях України та одна у закордонному спеціалізованому науковому виданні, три статті у збірниках матеріалів конференцій (загалом дві наукові статті мають ідентифікатор DOI), п'ять патентів України на корисну модель. Опубліковано 10 тез доповідей на міжнародних і вітчизняних конференціях.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертація Присталова А.І. включає анотацію (українською та англійською мовами), вступ, шість розділів, висновки, список використаних джерел літератури, п'ять додатків. До списку літератури входять 185 джерел, у тому числі 118 – латиницею. Матеріали роботи викладені на 164 сторінках друкованого тексту, з яких 124 сторінки основного тексту. Робота ілюстрована 37 рисунками і 14 таблицями.

Назва дисертаційної роботи відповідає її змісту, основні положення дисертації та автореферату є ідентичними, робота достатньо ілюстрована таблицями та рисунками. Зміст дисертації відповідає паспорту спеціальності 03.00.19 – кріобіологія

Дисертація написана державною мовою, аргументовано, логічно, науковим стилем, легко читається.

Зміст дисертації. У вступі автор обґрунтував актуальність теми роботи, сформулював мету та завдання досліджень, відобразив наукову новизну та практичну цінність обраної теми.

У розділі 1 «Огляд літератури» розглянуто та узагальнено результати досліджень вітчизняних і зарубіжних вчених з проблемних питань збереження генетичних ресурсів рослин узагалі і зокрема винограду у зв'язку зі станом виноградарства і розсадництва в Україні. Обґрунтовано роль і охарактеризовано способи і особливості гіпотермічного зберігання і кріоконсервації пилку, меристем, бруньок, живців, насіння винограду. Зазначено актуальність і важливість розробки нових методів насичення об'єктів трубчасто-капілярної будови, у тому числі бруньок винограду, кріозахисними речовинами, зокрема з використанням вакууму. На основі аналізу наявної інформації автор переконливо доводить перспективність методу вакуум-інфільтрація бруньок винограду розчинами PVS з наступною вітрифікацією.

У розділі 2 «Умови, матеріали та методика проведення досліджень» охарактеризовано умови закладки і вирощування ампелографічних колекцій; обґрунтовано вибір сортів винограду для досліджень, фазу та способи відбору бруньок, дано загальну характеристику кріозахисних розчинів. Детально описано методи вакуум-інфільтрації для насичення живців кріозахисними середовищами та відмиву від них, введення об'єктів у кріогенні умови та виведення з них, дегідратації та зворотної гідратації, вивчення впливу

кріопротекторів і сахарози, оцінки життєздатності живців після впливу вивчених чинників. У роботі застосовано сучасні методи низькотемпературної диференційної скануючої калориметрії для визначення фазових переходів і силування, прилад АЦП Mastech для моніторингу температури, конфокальну флуоресцентну мікроскопію для оцінки глибини проникнення речовин із розчину і рівномірності їх розподілення у різних шарах бруньок винограду за допомогою барвників.

У розділі 3 «Створення ампелографічних колекцій в умовах дослідних ділянок» здобувачем викладено історію виноградарства у Харківському регіоні і створення за активної участі автора колекційних виноградників на території Інституту проблем кріобіології та кріомедицини (65 зразків) і Біологічної станції ХНУ ім. В.Н. Каразіна (75 зразків), які, згідно Стандартів генних банків (ФАО, 2015) мають дублювати кріогенну колекцію. Дано характеристику колекційним зразкам, які послужили матеріалом для досліджень гіпотермічного та кріогенного зберігання генетичного різноманіття винограду.

У розділі 4 «Визначення ефективності методів насичення живців винограду» викладено розроблений здобувачем спосіб із застосуванням вакуум-інфільтрації для насичення рослинних об'єктів трубчасто-капілярної структури живильними та кріозахисними середовищами. Встановлено, що насичення живців з відкритими зрізами спостерігається вже при зниженому тиску 70 кПа. Час проходження розчину через живці винограду збільшувався зі збільшенням кількості вузлів на живці і зменшувався при збільшенні діаметра живців, що обумовлено анатомічною особливістю винограду. Показано перевагу вакуум-інфільтрації над пасивним насиченням живців винограду за швидкістю насичення (більш ніж у 10 разів) при збереженні життєздатності бруньок.

У живців сорту Шевченко встановлено динаміку дегідратації живців і пов'язаного з нею зниження їх життєздатності в умовах холодильної камери за температури 2 °С, зокрема, межа зневоднення живців склала приблизно 40 % вологості, за якої життєздатність вірогідно не змінювалась.

Зберігання живців шляхом відновлення початкової вологості методом вакуум-інфільтрації виявилось найбільш ефективним як для тривалого зберігання в умовах гіпотермії, так і для тимчасового утримання перед експериментом. Найбільш перспективний спосіб зберігання експериментального матеріалу був показаний при використанні живців з парафінованими зрізами.

У розділі 5 «Дослідження впливу сахарози на гермплазму винограду в умовах дегідратації» визначено діапазон оптимальних робочих концентрацій сахарози як середовища прекультивування перед кріоконсервуванням рослинних експлантів: для насичення сплячих бруньок винограду він становить 0,1 – 0,7М.

Встановлено, що зі зростанням концентрації вивчених розчинів сахарози після насичення бруньок винограду і часу експозиції час пробудження бруньок збільшувався до 5 разів у порівнянні з контрольною групою. При зниженні вологості живців винограду життєздатність зразків з вологістю 51 %, оброблених сахарозою, не змінювалась у залежності від концентрації сахарози і становила 100%. Для живців з вихідною вологістю 40.5 % життєздатність бруньок зростала зі збільшенням концентрації сахарози, що, на думку здобувача, може демонструвати захисну дію сахарози при дегідратації живців у межах ~ 40% вологості і нижче. За вологості зразків близько 30% сахароза не вчиняла захисної дії після зневоднення, а прийнятний відсоток життєздатності показано лише в контролі і в групі оброблення 0,1М розчином сахарози. Це, імовірно, пов'язано з додатковим зневодненням, яке знижує реальну вологість у живцях ще нижче заявленої.

У розділі 6 «Кріоконсервування ізольованих сплячих бруньок винограду» на прикладі бруньок винограду Руський Конкорд доведено важливість попередньої дегазації бруньок і кріозахисного середовища, яка полегшує насичення тканин бруньок кріозахисними середовищами. Показано, що оптимальним тиском для насичення бруньок винограду розчином PVS 2 є 40 кПа, який забезпечує високу життєздатність бруньок після насичення, а речовини з розчину проникають у всі їх шари. З використанням еозину та флуоресцину натрію показано, що 15-20 хв. є часом необхідним і достатнім для рівномірного розподілення речовин в усіх шарах бруньок. Цьому сприяє і більш повільне підвищення тиску до атмосферного протягом 2-2.5 хв.

Оцінка методом диференційної скануючої калориметрії (ДСК) здатності до склування та стабільності аморфного стану концентрованих і розведених розчинів кріозахисних речовин перспективних для кріоконсервування бруньок винограду показала, що розчини PVS1, PVS2 і PVS3 мають більш високу здатність до склування та стабільність аморфної фази порівняно з PVS4 і PVSN. PVS2 має високу склоутворюючу здатність навіть у 80 % концентрації, що робить його більш перспективним при кріоконсервуванні різноманітних рослинних об'єктів.

Порівняльна оцінка ефективності методу вакуум-інфільтрації і пасивного інкубування для насичення середовищами PVS бруньок винограду сорту Руський Конкорд методом низькотемпературної ДСК за зміною температур фазових переходів, ентальпій кристалізації та плавлення води і стрибка теплоємності при склуванні свідчить про те, що за використання вакуум-інфільтраційної вітрифікуючої (VIV) технології порівняно з пасивним інкубуванням значно збільшується концентрація кріозахисних речовин у бруньках винограду й істотно зменшується кількість вільної води, яка кристалізується при охолодженні, обумовлюючи пошкодження бруньок.

Таким чином, встановлено, що метод VIV дозволяє знизити в декілька разів час інкубації бруньок винограду у кріозахисному розчині, а отже вплив токсичної дії розчинів, у порівнянні з пасивним насиченням, а також забезпечує більш ефективно насичення бруньок кріозахисним розчином, що ефективно запобігає кристалізації при охолодженні бруньок винограду і сприяє переходу рідини у склоподібну фазу.

Показано, що збереженість виноградних бруньок для сортів Руський Конкорд, РР 101/14 та Загадка за тестом відновлення тетразолія хлористого складала 60 – 80% після застосування методу VIV. Життєздатність деконсервованих бруньок протягом 4 тижнів культивування становила 30% для сорту Руський Конкорд, 40% для Загадки, 0% для РР 101/14. При використанні пасивного методу насичення бруньок винограду перед кріоконсервуванням, збереженість та життєздатність деконсервованих зразків була 0% для усіх досліджених сортів винограду.

Оцінка стану тканин бруньок у контролі і після кріоконсервування методом конфокальної флуоресцентної мікроскопії показала, що після кріоконсервування методом VIV спектри власної флуоресценції практично не змінювались. Здобувач формулює робочу гіпотезу, що життєздатність бруньок після кріоконсервування з використанням VIV залежить від щільності деревини, відокремленості бруньок від структури живця, в'язкості робочих розчинів та менше залежить від морозовитривалості сортів.

Таким чином, використання методу VIV дозволяє підвищити збереженість та життєздатність ізольованих бруньок винограду при кріоконсервуванні у порівнянні зі стандартним методом насичення.

Висновки є логічним підсумком дисертаційної роботи, впливають із аналізу результатів досліджень, проведених автором, відповідають на поставленні для вирішення завдання.

Дискусійні положення, зауваження та пропозиції до дисертаційної роботи. Оцінюючи в цілому позитивно дисертацію та автореферат А.І. Присталова, слід вказати на наявність окремих зауважень та дискусійних моментів у роботі:

1. При дослідженні рослинного матеріалу дуже важливо вказувати роки отримання експериментальних зразків, що у роботі не зазначено.

2. У розділі «Матеріали і методи досліджень» було б доцільно не у підрозділі «Матеріали», а в окремому підрозділі «Умови проведення досліджень» описати технологічні аспекти закладання ампелографічних колекцій.

3. Не зрозуміло, яким чином та за якими ознаками проводилася оцінка визрівання виноградної лози. Бажано було б вказати цю інформацію у розділі «Матеріали і методи досліджень».

4. Під час культивування рослинного матеріалу після кріоконсервування дуже важливим є склад відновлюючих середовищ, чому у роботі не приділяється достатньої уваги.


5. Етап видалення кріозахисного середовища потребує особливої уваги і може впливати на рівень життєздатності рослинних експлантів. Використаний у роботі лише один цикл відмивання з використанням вакуум-інфільтрації може бути недостатньо ефективним.

Однак, вказані зауваження не знижують загальної позитивної оцінки дисертаційної роботи, оскільки вони можуть бути роз'ясненими під час наукової дискусії.

Загальний висновок про роботу. Аналіз дисертації, автореферату, наукових публікацій автора свідчить, що дисертаційна робота Присталова Антона Ігоровича «Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду» є завершеною, самостійною науковою працею, що вирішує важливе наукове завдання щодо розробки наукових основ довготривалого збереження генетичних ресурсів винограду шляхом гіпотермічного та кріозберігання живців з застосуванням вакуум-інфільтраційної вітрифікуючої технології насичення живців та ізольованих бруньок винограду кріозахисними і живильними середовищами та формування польового генбанку.

Дисертаційна робота «Вплив складу кріозахисного середовища та методів охолодження на життєздатність гермплазми винограду», відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів...», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, а її автор Присталов Антон Ігорович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія.

Кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник,
провідний науковий співробітник лабораторії
інтродукції та зберігання генетичних ресурсів рослин
Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН


Р.Л. Богуславський

Підпис Р.Л. Богуславського засвідчую:

вчений секретар інституту,
доктор сільськогосподарських наук

 О.М. Шабета

21.04.2021 р.

