

**ВІДГУК**  
**офіційного опонента на дисертаційну роботу Субіна Олександра**  
**Володимировича**  
**«Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* DUCH.) проти**  
**основних фітопатогенів» на здобуття наукового ступеня кандидата**  
**біологічних наук за спеціальністю 06.01.11 – фітопатологія.**

*Детальний аналіз дисертації Субіна О.В. «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* DUCH.) проти основних фітопатогенів» дозволяє офіційному опоненту сформулювати наступні узагальнені висновки щодо актуальності, ступеня обґрунтованості основних наукових положень, висновків, рекомендацій, наукової новизни, практичного значення, а також загальної оцінки роботи.*

**Актуальність теми дисертаційного дослідження**

Дисертаційна робота, яку виконав Субін Олександр Володимирович була спрямована на розроблення нових альтернативних засобів захисту рослин внаслідок індукованої стійкості до фітопатогенів з використанням адаптивних можливостей самих рослин. Адже взаємодії у системах еліситор – рослина, еліситор – патоген, еліситор – рослина – патоген є ще нерозкритим до кінця. Тому вважаю, що питання відносно механізмів захисної дії вторинних метаболітів при контакті з патогеном надасть можливості розробити ефективні стратегії захисту рослин шляхом запуску реакції відповіді та формування системної набутої стійкості рослинних організмів проти фітопатогенів.

Дослідження еліситорних властивостей та прямої біоцидної дії хітозану різного біологічного походження проти основних фітопатогенів суниці садової є актуальними. З'ясовано, що рівень відносної експресії генів рослин *Fragaria ananassa*, які кодують PR-білки варіював залежно від біологічного походження хітозану, часу після обробки. Відносний рівень експресії PR-генів за умов обробки рослин низькомолекулярним хітозаном був вищим порівняно з високомолекулярним.

Актуальним є особливості накопичення елагової кислоти, як одного з основних прекурсорів синтезу захисних фенольних сполук, зокрема гідролізованих танінів. Це свідчить про реактивність відповідних реакцій, як однією із стратегій захисту рослин. Найбільш вираженим було збільшення вмісту в листках ГГДФ-глюкози, галоїлхіної кислоти, пентозиду елагової кислоти, глікозиду кемпферола та елагової кислоти в ранкові години з подальшим зниженням у вечірній і нічний час доби. Сполуки цього класу підвищують стійкість рослин проти фітопатогенів. Задовільний контролюючий ефект хітозану відмічався для збудників антракнозу – грибів роду *Colletotrichum* Corda. та збудників чорної кореневої гнилі – *Rhizoctonia* spp.

Доведено диференціацію антимікробної активності та пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх суміші щодо різних ізолятів та штамів фітопатогенних мікроорганізмів. Визначено, що сумісність хітозану і сорбінової кислоти сприяла пригніченню росту міцелію ізолятів збудників родів *Fusarium* та *Alternaria*. Показано, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію щодо збудників бактеріозів суниці садової.

Маю відмітити, що актуальність підібраної дисертантом теми є дещо унікальною та на часі необхідною.

**Основні наукові положення, висновки та рекомендації, що сформульовані у дисертації, ступінь їх обґрунтованості та достовірності**  
**Наукова новизна дисертаційної роботи**

Дисертантом вперше отримано певні результати наукових досліджень, а саме:

- встановлено відмінності захисних реакцій рослин за синтезом фенольних сполук у тканинах листків залежно від біологічного походження хітозану; з'ясовано, що низькомолекулярний хітозан, що має грибне походження підвищує мобілізацію рослинного організму проти потенційних фітопатогенів через збільшення вмісту фенолів та підвищення загального антиоксидантного потенціалу;

- додавання саліцилової кислоти у живильне середовище стимулює гомогенез у рослин суниці садової, який відбувається на фоні оберненої залежності між показниками площі листків та вмістом у тканинах флавоноїдів;
- комплексні біопрепарати Триходермін, Планриз та Фітоцид підвищують стійкість рослин суниці садової до ураження збудником чорної кореневої гнилі, що автором доведено експериментально;
- виявлено особливості відносного рівня експресії чотирьох генів PR-білків суниці садової. Встановлено, що відносний рівень експресії цих генів після обробки рослин низькомолекулярним хітозаном, що виділений з плодових тіл печериці, виявився вищим у порівнянні з високомолекулярним хітозаном тваринного походження;
- визначено, що у відповідь на обробку рослин суниці садової низько- і високомолекулярним хітозаном в асиміляційних органах підвищується вміст 2,3-S-гексагідроксидифеніл-D-глюкози. Показано особливості накопичення елагової кислоти як одного з ключових компонентів захисних реакцій рослин проти збудників хвороб;
- доведено, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію стосовно *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* і *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* та антифунгальну дію щодо видів родів *Fusarium* і *Alternaria*.

Виконані автором дослідження відрізняються від раніше відомих в Україні розширеним спектром об'єктів вивчення та комплексним підходом до вирішення поставленої мети.

### **Практичне значення отриманих результатів**

Маю відмітити, що дисертант має досить вагомі практичні результати. За результатами виконаних досліджень автором вперше розроблено і впроваджено технологію клонального мікророзмноження *in vitro* та промислове виробництво ягоди суниці садової сорту «Аліна» на базі СТОВ «Світанок». (Київська область).

Вперше отримано і досліджено методом ферментативного гідролізу плодових тіл шампінйона двоспорового склад моноцукрів хітозану, що є дуже важливим практичним значенням для системного захисту рослин різних видів.

Видано науково-методичні рекомендації «Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин». Впроваджено у навчальний процес для викладання дисципліни «Інструментальні методи аналізу для ОС «Магістр» спеціальності «Екологічна біотехнологія та біоінженерія» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології НУБПУ.

### **Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях**

Дисертацією є закінчене наукове дослідження, що виконано на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії НУБП України в рамках науково-технічних програм за темами «Генетична паспортизація і технологія мікроклонального розмноження та оздоровлення високопродуктивних сортів ягідних культур» (номер державної реєстрації 0115U003377, 2015 –2016pp.) та «Дослідження механізмів адаптогенної дії хітозан-меланінового комплексу на рослинно-мікробні системи» (номер держ.реєстрації 0117U002540, 2017 – 2019pp.).

Основні результати досліджень за темою дисертації опубліковані в 15 наукових працях, з яких монографія, 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у наукових виданнях інших держав, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, стаття в іншому науковому виданні України, методичні рекомендації, 5 тез наукових доповідей.

Обсяг друкованих робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікацій основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Зміст автореферату є ідентичним до змісту дисертації та достатньо повно відображає основні положення дослідження.

## **Аналіз змісту дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 205 сторінках комп'ютерного тексту, основна її частина містить 29 таблиць та 54 рисунки. Дисертація складається з анотацій, переліку умовних позначень, вступу, семи розділів, висновків, списку використаних джерел (налічує 339 найменувань, з них 245 латиною) та додатків.

**Розділ 1. «Огляд літератури»** Дисертантом узагальнено літературні дані, проведено досконалий, вищого рівня аналітичний огляд літератури щодо головних аспектів стійкості рослин проти основних фітопатогенів. Розглянуто роль еліситорів в системній набутій стійкості рослин. Проведено аналіз публікацій біоцидної та еліситорної активності хітозану залежно від його біологічних та фізико-хімічних властивостей.

**Розділ 2. «Матеріали і методи дослідження».** Дисертантом відмічено місце, умови та методика проведення досліджень.

Як модельні культури використано рослини *Nicotiana tabacum* L., *Fragaria ananassa* Duch., які було отримано за допомогою мікроклонального розмноження та адаптовано до певних умов. Методи, що було задіяно: ПЛР у режимі реального часу; сумарне визначення фенольних сполук проводили методом спектрометрії; якісний склад біохімічних сполук у листках суниці садової визначали методом тонкошарової хроматографії; мікобіоту модельних культур вивчали з використанням мікологічних методів тощо.

**Розділ 3. «Вплив саліцилової кислоти і комплексних біопрепаратів на фенольний синтез морфо-фізіологічних процесів модельних культур в умовах *in vitro*»**

Рослини в природних умовах постійно зазнають біотичних та абіотичних стресів. Для досліджень доцільно використовувати генетично однорідні модельні культури, які отримано в культурі *in vitro* та вирощено у сталих умовах. Дисертантом для оптимізації методики мікроклонального розмноження модельних рослин досліджено вплив різних регуляторів росту на процеси росту експлантів *in vitro*. Встановлено експериментально, що додавання саліцилової

кислоти, яка є індуктором стійкості у рослин, в живильне середовище у концентрації 25 мг/мл значно прискорює процеси пагоноутворення. Цікаво, що саліцилова кислота спричиняє зміни у вторинному метаболізмі, які супроводжуються синтезом біологічно активних сполук з властивостями регуляторів росту. Також важливо, що збільшення концентрації хлорогенової кислоти у тканинах листків суниці садової за впливу екзогенної саліцилової кислоти є фактом індукованої перебудови фенілпропаноїдного синтезу, що суттєво впливає на фізіологічний стан рослин, прискорює процеси органогенезу у регенерантів в умовах *in vitro*, що є важливим показником стійкості рослин. Вражає високим рівнем біологічної ефективності біопрепарат Триходермін, інші препарати мали задовільний рівень. Вважаю, що Триходермін, Фітоцид, Планриз та інші біопрепарати можуть збільшувати кількість адаптованих рослин, підвищувати стійкість рослин до ґрунтових фітопатогенів.

Порівняно до контролю та еталону найкращим виявився варіант із застосуванням суспензії, що містила конідії та міцелій *Trichoderma lignorum* (приживлення рослин-регенерантів становила в середньому 92,4-97,3%. При цьому спостерігався значний рістстимулюючий ефект: висота пагонів рослин збільшувалась на 40-55%, а загальна довжина коренів на 40-48 %. Застосування біопрепаратів Фітоцид, ФітоХелп та Планриз також сприяло збільшенню приживлення рослин на етапі їх адаптації на 18-26%, 13-16% та 17 – 21% відповідно.

**Розділ 4. «Експресія генів PR-білків рослин за дії хітозанів грибного і тваринного походження»** визначено, ключовими параметрами біологічної активності хітозанів є молекулярна маса та ступінь деацетилювання. Ступінь деацетилювання хітозану, що отриманий з личинок *Hermetia illucens*, тобто тваринного походження, становив 90,69% , отриманого з плодових тіл *Agaricus bisporus* - 80,39%. Методом газової хроматографії визначено, що до складу грибного хітозану, крім глюкозамінів входять шість моноцукрів, серед яких ідентифіковано рамнозу і фукозу. Моноцукри можуть створювати складну

розгалужену систему полісахаридних структур, які суттєво вирізняють грибний хітозан від хітину і хітозану тваринного походження. За результатами досліджень встановлено, що перші ознаки впливу хітозану на експресію генів PR-білків було виявлено у перші години. За обробки рослин високомолекулярним хітозаном рівень експресії усіх досліджуваних генів дещо варіював з найвищим значенням через 24 год для PR-2a, 48 год – для Pr-2b. Високу чутливість до хітозану підтвердили реакції рослин *N.tabacum* і *F.ananassa*. Визначили також здатність хітозану проникати у тканини рослин і взаємодіяти з відповідними сенсорними системами, що відповідні за індуковані захисні реакції.

**Розділ 5. « Специфіка захисних реакцій рослин модельних культур за дії хітозанів грибного і тваринного походження»** Важливим було те, що обробка рослин хітозанами сприяла активному збільшенню її кількості у листі *F.ananassa*.

Виявлено відмінності у первинних адаптивних реакціях рослин на хітозан залежно від його походження. Низькомолекулярний хітозан швидко долає тканинні бар'єри, проникає у протопласт і спричинює різке збільшення вмісту фенолів і підвищення антиоксидантного потенціалу тканин листків. Значне збільшення вмісту фенолів і загального антиоксидантного потенціалу у відповідь на дію низькомолекулярного хітозану грибного походження цілком можливо розглядати як загальну мобілізацію рослинного організму проти аотенційного патогена.

**Розділ 6. Вплив хітозану грибного і тваринного походження на видовий склад мікобіоти модельних культур»** за результатами досліджень дисертантом встановлено, що видовий склад епіфітної мікобіоти суниці садової налічує 13 видів грибів різних відділів, до та після обробки рослин розчинами хітозанів. Ідентифіковано види *Fusarium* – збудники корневих гнилей та в'янення суниці садової., на листі суниці садової виявляли види *Alternaria tenuissima* (92.3%), *Penicillium* sp.(76,9%), *Fusarium* sp.(69?2%). Високий рівень заселення листків суниці садової в контролі характеризувався гриб *Humicola fuscoatra* (50,0%), а

після обробки низькомолекулярним і високомолекулярним хітозанами - *Alternaria tenuissima* (44,4 і 37,5%). *Aspergillus nidulans*, *Nigrospora oryzae*, виділяли з листків суниці в контрольній групі, вид *Trichoderma viride* ізолювали після застосування низькомолекулярного хітозану через 48 год. У результаті досліджень ризоплани суниці садової після обробки водою і хітозанами ізолювано та ідентифіковано 8 видів грибів, серед яких виявлено збудників хвороб кореневої системи: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma herbarum*, *Rhizoctonia* sp.

Найчисельнішим серед мікобіоти ризосфери виявився *Penicillium* sp., якого спостерігали доволі.

**Розділ 7. «Антимікробна активність хітозану та біологічно активних композицій на його основі»** Встановлено зміну антибактеріальної активності і пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх комплексу щодо різних ізолятів і штамів фітопатогенних бактерій. Композиція хітозану і сорбінової кислоти також пригнічувала ріст міцелію ізолятів збудників родів *Fusarium* і *Alternaria*. Суміш речовин пригнічувала ріст міцелію, що свідчить про адитивний ефект взаємодії речовин щодо фітопатогенних мікроміцетів.

**Загальні висновки дисертаційної роботи відповідають її змісту, конкретно, стисло висвітлюють основні наукові результати.**

Загалом можна зазначити, що дисертація Субіна Олександра Володимировича є закінченою науковою працею, в якій отримані нові наукові результати, що мають теоретичну та практичну цінність.

**Дискусійні положення та зауваження стосовно дисертаційного дослідження офіційного опонента Бабаянц О.В. щодо дисертаційної роботи Субіна О.В. «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* DUCH.) проти основних фітопатогенів»**

1. Значна частина роботи це є фітопатологія. Однак, досить багато матеріалів стосується біохімії, біотехнології та мікробіології, що є майже на межі плюса та мінуса.



2. Властивості та біоцидна дія хітозану різного біологічного походження, відповідні реакції модельних рослин у відповідь на обробку розчинами хітозану, подаються у більшості лише як зміни рослини у стресових ситуаціях. Як вважаєте?

3. Розділ 1.1. стор. 21-23. Так до якого виду імунних реакцій рослини відноситься індукований імунітет? До специфічних, які проявляються у відповідь на ураження фітопатогеном, чи загальних чинників, яких присутні у рослині постійно? На жаль з тексту не зрозуміло.

4. Розділ 1. стор 20-45. Дуже добре, навіть блискуче висвітлені питання, заявлені у літ. огляді. І геть жодного слова про основні хвороби суниці садової! Адже саме тут є фітопатологія!

5. Розділ 2. На жаль у розділі «Матеріали і методика» не має підрозділу, де чітко визначено, що саме слугувало матеріалом дослідження (сорти полуниці та їх опис, біопрепарати та їх опис, збудники хвороб та ін.). Це все дається у тексті дещо розрізнено.

6. Розділ 2.4. У якості стерилізуючих агентів використовували 1% розчин гіпохлориту натрію, 20% розчин перекису водню, 0,1% розчин сулеми та 1% розчин нітрату срібла. Досить небезпечні препарати для такої роботи.

7. Розділ 3.5. стор.74-75. Як відбувалося штучне зараження ґрунтової суміші мікроміцетами роду *Rhizoctonia*? Яку культуру використовували? Це ж є та крихітка фітопатології на увесь цей розділ, загалом чисто біотехнологічний.

8. Розділ 5. стор.98. Усі перелічені фенольні сполуки зазвичай є присутні у листі здорової рослини та є факторами пасивного імунітету. Кількість їх, чи деяких з них зростає у відповідь на інфікування. Обробку хітозаном рослина сприймає як стрес і звичайно кількість цих компонентів зростає. Цікаво було б порівняти незалежно реакцію рослини, як на обробку хітозаном, так і на інфікування.

9. Розділ 5. Чи є сенс у стимулюванні рослини на виробіток фенольних сполук у відсутності патогена? Здається мені, що рослини у цій ситуації виснаджується.

10. Розділ 5. стор. 109, 115. У обговоренні наводиться дуже багато аналізу літературних джерел. Краще було б повернутися до розділ 1 «Огляд літератури».

11. Розділ 6. стор. 127 Як зрозуміти: найчастіше на листках суниці садової зустрічались види *Alternaria tenuissima*, *Penicillium* sp. і *Fusarium* sp. Адже *Alternaria tenuissima* вид, а *Penicillium* sp. і *Fusarium* sp. представляють кожен свій рід з величезним комплексом видів. Чому у такому разі іде конкретизація тільки по виду *Alternaria tenuissima*?

12. Табл. 6.1. стор.128 Під *Fusarium* надто великий та складається з багатьох видів, які дуже різняться за ознакою паразитизму - від сапрофітів до факультативних паразитів. Краще було би конкретизувати видовий склад *Fusarium*, які були у випробуваннях.

13. стор.129. Отже, окремі ланки фенольного синтезу виявляють високу чутливість до хітозанів, а відповідна реакція рослини залежить від їхньої молекулярної маси. На скільки небезпечні для рослин, на думку здобувача, гриби родів *Aspergillus* та *Penicillium* у якості епіфітної та різосферної мікрофлори?

14. Розділ 7.1, стор. 140-144.. У підрозділі жодного згадування на збудниках яких хвороб встановлювали диференціацію антибактеріальної активності та пролонгованості дії хітозану, сорбінової кислоти та їх суміші? Адже номер ізоляту, це ще не все. Бактерії нас цікавлять лише як збудники конкретних хвороб. Краще б було уточнити ще раз. Адже це фітопатологія.

15. Висновки до розділу 7. стор.156. Як співвідносяться дані, що отримані на культуральних середовищах з дією хітозану та його сумішей на поверхні та різосфері рослин у польових умовах?

16.Чому антимікробна дія біологічно активної композиції на мікроорганізми-антагоністи встановлювалася на бактеріях, які спричиняють бактеріальну гниль картоплі та бактеріальну плямистість перцю? Адже багато бактеріальних захворювань розвивається і на суниці садовій, якій і присвячена робота.

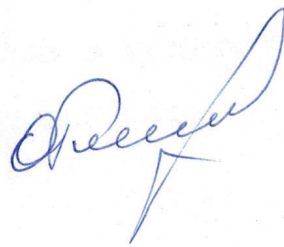
### Загальна оцінка дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Субіна Олександра Володимировича, є структурованою, цілісною, завершеною науковою роботою. У дисертації становлено особливості впливу саліцилової кислоти і хітозанів різного біологічного походження і молекулярної маси на морфогенез модельних рослин динаміку синтезу ними фенольних сполук, видову різноманітність мікобіоти філоплани, ризосфери, епіфітних мікроміцетів, збудників бактеріозів і мікозів.

Оформлення дисертації і автореферату в цілому, з урахуванням зазначених вище зауважень відповідає діючим нормативним документам.

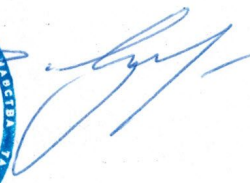
Вважаємо, що представлена дисертаційна робота «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* DUCH) проти основних фітопатогенів» відповідає вимогам, що висуваються до кандидатських дисертацій згідно з пп. 13 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор, Субін Олександр Володимирович цілком заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 06.01.11 – фітопатологія.

**Офіційний опонент,**  
докторка біологічних наук,  
старший науковий співробітник,  
завідувачка відділу фітопатології і ентомології  
Селекційно-генетичного інституту –  
Національного центру насіннєзнавства  
та сортовивчення (СГІ – НЦНС)



Бабаянц О.В.

Підпис Бабаянц О.В. засвідчую,  
Вчений секретар СГІ – НЦНС

Пушкаренко О.

14.04.2021р.