

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Субіна Олександра Володимировича «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) проти основних фітопатогенів», що представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія»

**Актуальність** дисертаційної роботи О.В. Субіна обумовлена рядом причин. Рослини у процесі свого розвитку зазнають постійного впливу комплексу абіотичних і біотичних стресових чинників. Упродовж тривалого часу система захисту рослин базувалась на використанні лише хімічних сполук. Проте в екологічних умовах сьогодення нагально постає проблема розробки сучасних методів захисту рослин, що базуються на використанні певних індукторів, які запускають захисні реакції і стимулюють власну стійкість рослин до несприятливих факторів довкілля і патогенів зокрема. Увагу багатьох дослідників зосереджено на таких біогенних еліситорах як гормони стресу, саліцилова і жасмонова кислоти, хітин, хітозан тощо. Однак особливості їхнього впливу на рослини і мікроорганізми, які, залежно від механізмів взаємодії, розпізнаються як мутуалісти чи патогени, досліджені недостатньо.

Виходячи з викладеного, дисертант поставив собі за мету дослідити вплив еліситорів (саліцилової кислоти і хітозанів) на морфогенез і синтез фенольних сполук модельними рослинами, встановити їхню роль у формуванні індукованої стійкості рослин проти основних фітопатогенів, вивчити біорізноманітність мікобіоти філоплани, ризоплани і ризосфери рослин.

**Опублікування результатів дисертації.** Основні матеріали дисертації О.В. Субіна повною мірою відображено та опубліковано у 15 наукових працях: одній монографії; п'яти статтях у наукових фахових виданнях України; трьох статтях у наукових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних; двох статтях у наукових виданнях інших держав, що включені до міжнародної наукометричної бази даних Scopus; одній статті в іншому науковому виданні; науково-методичних рекомендаціях; п'яти тезах наукових доповідей.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення і результати дисертаційної роботи було представлено на п'яти вітчизняних і міжнародних конференціях: IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Україна, 2015); VIII Міжнародній конференції «Регуляція росту, розвитку и продуктивности растений» (Білорусь, 2015); IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених «Селекція, генетика та технології вирощування сільськогосподарських культур» (Україна, 2016); IV Міжнародній науковій конференції молодих дослідників «Biotechnology. Science and Practice» (Вірменія, 2017); II Міжнародній конференції «Smart Bio» (Литва, 2018).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано на базі навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії Національного університету біоресурсів і природокористування України в рамках науково-технічних програм за темами



«Генетична паспортизація і технологія мікроклонального розмноження та оздоровлення високопродуктивних сортів ягідних культур» (№ державної реєстрації 0115U003377, 2015-2016) і «Дослідження механізмів адаптогенної дії хітозан-меланінового комплексу на рослинно-мікробні системи» (№ державної реєстрації 0117U002540, 2017-2019).

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертаційній роботі О.В. Субіна досліджено фізико-хімічні властивості і встановлено молекулярну масу і ступінь деацетилювання хітозанів, виділених з базидієвих грибів і комах. Показано значні відмінності за синтезом фенольних сполук у листках тестових рослин залежно від біологічного походження хітозану. Виявлено, що за дії низькомолекулярного хітозану (НМХ) у рослин підвищуються вміст фенолів і загальний антиоксидантний потенціал, що сприяє мобілізації захисних систем рослинного організму проти дії потенційних фітопатогенів.

Встановлено, що індукована через саліцилатний шлях системна стійкість модельних рослин супроводжується активним синтезом хлорогенової кислоти та інших кон'югатів оксикоричних кислот, які мають високий антиоксидантний потенціал і є неспецифічними регуляторами росту.

Дисертантом експериментально доведено, що комплексні біопрепарати Триходермін, Фітоцид і Планриз підвищують стійкість рослин суниці садової до ураження збудником чорної кореневої гнилі *Rhizoctonia* sp.

Автором розроблено специфічні праймери для ампліфікації ділянок екзонів чотирьох генів PR-білків суниці садової: PR-1, PR-2a ( $\beta$ -1,3-глюканаза), PR-2b (ендо- $\beta$ -1,4-глюканаза) і PR-3 (хітиназа); встановлено, що відносний рівень експресії цих генів після обробки рослин НМХ був вищим порівняно з високомолекулярним хітозаном (ВМХ).

О.В. Субін показав, що в асиміляційних органах суниці садової за дії НМХ і ВМХ підвищується вміст 2,3-S-гексагідроксибеніл-D-глюкози, а також особливості накопичення елагової кислоти – одного з ключових компонентів захисних реакцій рослин проти патогенів.

Дисертант встановив, що комплекс хітозану з сорбіновою кислотою має пролонговану антибактеріальну дію щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* і *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* та антифунгальну дію на види родів *Fusarium* і *Alternaria*.

**Практичне значення одержаних результатів.** Слід зазначити, що представлена дисертаційна робота має фундаментальний характер, а отримані результати, без сумніву, також і практичне значення. Важливість поставлених у роботі завдань підтверджується розробкою і впровадженням технології клонального мікророзмноження *in vitro* у промислове виробництво ягоди суниці садової сорту «Аліна» на базі СТОВ «Світанок» (Київська область). Дисертантом вперше отримано і досліджено моносахаридний склад хітозану *Agaricus bisporus*, що має вагоме значення для системного захисту рослин різних видів.

Отримані О.В. Субіним результати впроваджено в навчальний процес і видано науково-методичні рекомендації «Застосування молекулярно-біологічних методів у дослідженнях біологічно активних речовин» для викладання дисципліни «Інструментальні методи аналізу» для ОС «Магістр» спеціальності



«Екологічна біотехнологія та біоінженерія» на факультеті захисту рослин, біотехнологій та екології Національного університету біоресурсів і природокористування України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційну роботу викладено на 205 сторінках друкованого тексту. Вона містить анотації українською та англійською мовами, перелік публікацій автора, вступ, 9 розділів, висновки, список використаних джерел літератури із 339 найменувань (включаючи 245 іншомовних) і чотири додатки. Робота ілюстрована 54 рисунками і містить 29 таблиць. Назва роботи відповідає змісту, а отримані результати підтверджені фактичним матеріалом і не викликають сумнівів.

**Оцінка змісту дисертації, її завершеності у цілому, ідентичності змісту автореферату й основних положень дисертації.**

У вступі до дисертаційної роботи автор обґрунтовує актуальність обраної теми; наводить зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами навчально-наукової лабораторії біотехнології та клітинної інженерії Національного університету біоресурсів і природокористування України, де виконано роботу; формулює мету, завдання, предмет і об'єкт дослідження; коротко характеризує методи досліджень; наводить наукову новизну і практичне значення отриманих результатів; особистий внесок здобувача; вказує конференції, на яких було представлено результати наукових досліджень, та характеризує публікації за темою дисертації.

У розділі 1 (огляд літератури) О.В. Субін продемонстрував добре володіння сучасними даними світової наукової літератури. Дисертант представив дані щодо механізмів індукованої стійкості рослин до біотичних факторів, типів еліситорів і їхньої ролі в активації захисту рослин від патогенів. Більш детально викладено відомості щодо саліцилової кислоти, екзогенних індукторів синтезу і функцій білків, що пов'язані з патогенезом (PR-білки рослин). Автор вказує також, що у відповідь на зараження патогенами рослини продукують  $\beta$ -1,3-глюканазу і хітинази, які розщеплюють полісахариди  $\beta$ -1,3-глюкан і хітин, а отже їх синтез пов'язаний з захисними реакціями. Окремий підрозділ огляду присвячено ролі різних груп вторинних метаболітів рослин і фенольних сполук зокрема у формуванні стійкості рослин проти збудників хвороб і шкідників. Особливу увагу автор приділив унікальним фізико-хімічним властивостям хітозанів різного біологічного походження, їхній здатності індукувати системні захисні реакції рослин, а також біоцидній дії на фітопатогени.

У розділі 2 «Матеріали і методи досліджень» дуже детально описано широкий спектр сучасних методів, які було використано для проведення досліджень. Як модельні культури використано рослини *Nicotiana tabacum* L. (сорт Гавана) і *Fragaria ananassa* Duch. (сорт Аліна, Берегиня, Голосіївська рання, Дашенька київська і Факел); представлено умови їх вирощування.

Автором проведено визначення експресії PR-білків, захисних реакцій, динаміки фенольних сполук, динаміки видового складу мікобіоти філоплани, ризоплани і ризосфери.

О.В. Субін представив методику екстракції хітинового матеріалу. Визначення ступеня деацетилювання і молекулярної маси хітозанів різного



біологічного походження здійснено з використанням фізико-хімічних методів. У роботі використано також молекулярно-генетичні (виділення РНК/ДНК, проведення полімеразної ланцюгової реакції і ПЛР у реальному часі, електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот у агарозному гелі), хроматографічні (визначення якісного і кількісного складу вторинних метаболітів за допомогою ВЕРХ, ТШХ, ВЕТШХ), мікробіологічні і мікологічні (вивчення мікобіоти філоплани, ризоплани і ризосфери рослин) методи досліджень. Визначення вмісту фотосинтетичних пігментів, загального вмісту фенольних сполук, їх антиоксидантної активності, кількісного вмісту флавоноїдів, моносахаридного складу хітозанів, специфічне біотестування на гіберелову активність проведено з використанням біохімічних і фізіологічних методів досліджень.

Для математичної обробки отриманих експериментальних даних використано мультирегресійний, кореляційний і кластерний аналізи.

**Розділ 3** «Вплив саліцилової кислоти і комплексних біопрепаратів на фенольний синтез та стійкість модельних культур проти збудника чорної кореневої гнилі» є дуже важливим у представленій дисертаційній роботі. О.В. Субін підібрав і оптимізував методику мікроклонального розмноження суниці садової сорту Аліна. Автор приходить до висновку про те, що на формування листків рослин впливає не загальна кількість фенолів, а їх якісний склад. Саліцилова кислота (СК) прискорює процеси пагоноутворення експлантів суниці садової в культурі та є індуктором біохімічної перебудови вторинного метаболізму рослин, внаслідок чого синтезуються сполуки з властивостями регуляторів росту. Так, додавання СК до базових живильних середовищ стимулює синтез хлорогенової кислоти, її ізомерів та інших кон'югатів оксикоричних кислот. Дисертантом підібрано середовище для ризогенезу та адаптації суниці садової, ефективність адаптації при цьому становила понад 90%. Показано, що застосування біопрепаратів Триходерміну, Фітоциду, ФітоХелпу і Планризу сприяло підвищенню кількості адаптованих рослин суниці садової у середньому на 17-28%, активізації розвитку нових пагонів і листків, прискоренню утворення кореневої системи, підвищенню стійкості рослин до ґрунтових фітопатогенів роду *Rhizoctonia*.

**Розділ 4** «Експресія генів PR-білків рослин за дії хітозанів грибного і тваринного походження» присвячено визначенню фізико-хімічних і біохімічних властивостей хітозанів, які отримано з плодових тіл *Agaricus bisporus* і комах *Hermetia illucens*. Встановлено, що до складу грибного хітозану входять рамноза і фукоза (сумарна частка 23%) і впливають на специфіку його дії на рослини.

Для дослідження експресії генів захисних PR-білків після обробки модельних рослин розчинами хітозану на основі аналізу депонованих у GenBank нуклеотидних послідовностей розроблено специфічні праймери для ампліфікації ділянок екзонів п'яти PR-генів, як референсний ген використовували ген актину, для якого раніше було показано конститутивну експресію. Оптимізовано процеси виділення РНК з модельних рослин і проведення ПЛР для визначення експресії генів PR-білків. Автор встановив, що рівень відносної експресії генів *Fragaria ananassa*, які кодують PR-білки, значно варіює залежно від біологічного



походження хітозану, концентрації розчину і часу після обробки. Відносний рівень експресії PR-генів за обробки рослин НМХ був вищим порівняно з ВМХ. У листках *F. ananassa* вже через 1 годину відносна кількість копій мРНК 1,3-глюканази (PR-2a) поступово збільшувалася і досягала максимуму на 3 добу, для хітинази (PR-3) активність гену різко зростала після 12 год, максимум експресії гену основної  $\beta$ -1,3-глюканази (PR-2b) встановлено на 48 год.

Важливим результатом розділу 5 «Специфіка захисних реакцій рослин модельних культур за дії хітозанів грибного і тваринного походження» є встановлення динаміки накопичення фенольних сполук і відмінностей реакцій рослин суниці садової на обробку НМХ і ВМХ. За обробки рослин низькомолекулярним хітозаном у листках на 12 год кількість загальних фенолів і антиоксидантів збільшувалася в 1,9 і 3,2 рази відповідно. На противагу цьому, розчин ВМХ різко знижував вміст вільних і слабкозв'язаних з клітинними стінками фенольних сполук.

О.В. Субін встановив стрімке накопичення елагової кислоти (один з основних прекурсорів синтезу захисних фенольних сполук, зокрема, гідролізованих танінів) впродовж першої години дії розчинів НМХ і ВМХ з подальшою нормалізацією фонового рівня, що свідчить про реактивність реакцій рослин як однієї із стратегій захисту.

Дисертант виявив добові коливання вмісту елаготанінів і флавоноїдів у листках модельних культур. Найбільш вираженим було збільшення вмісту сполук, що підвищують стійкість рослин проти фітопагенів – ГГДФ-глюкози, галоїлхінної кислоти, пентозиду елагової кислоти, глікозиду кемпферолу та елагової кислоти в ранкові години з подальшим зниженням ввечері і вночі. Виявлена автором закономірність подібна до реакції рослин на хітозан, що свідчить про універсальність захисних реакцій незалежно від природи їхньої індукції.

У розділі 6 «Вплив хітозану грибного і тваринного походження на видовий склад мікобіоти модельних культур» представлено результати дослідження видового складу, рівня заселення і частоти трапляння мікроміцетів філоплани, ризоплани і ризосфери *F. ananassa*. Автором встановлено, що видовий склад мікобіоти філоплани і ризосфери *F. ananassa* достовірно відрізняється. Обробка поверхні листків НМХ суттєво впливала на видовий склад мікобіоти філоплани суниці садової на відміну від обробки рослин ВМХ навіть за різної експозиції.

Результати розділу 7 «Антимікробна активність хітозану та біологічно активних композицій на його основі» свідчать про те, що антагоністична активність і пролонгована дія хітозану, сорбінової кислоти і їх суміші відрізняється у різних штамів фітопатогенних мікроорганізмів. Встановлено бактеріостатичну дію суміші хітозану і сорбінової кислоти на культури фітопатогенних бактерій впродовж 5 діб. Композиція хітозану і сорбінової кислоти пригнічувала ріст міцелію представників родів *Fusarium* і *Alternaria*. Показано, що за взаємодії з розчином сорбінової кислоти мікроміцети-антагоністи роду *Trichoderma* проявили більш виражену антагоністичну дію на гриби роду *Fusarium*.



**Обґрунтованість і достовірність наукових положень і висновків,** сформульованих за результатами досліджень, не викликає жодних сумнівів, оскільки вони базуються на значному фактичному матеріалі, виконані з використанням класичних і сучасних методичних підходів і підтверджені статистичним аналізом отриманих даних. Це дозволило автору дослідити еліситорні і біоцидні властивості хітозану різного біологічного походження; встановити особливості індукції хітозанами реакцій системного захисту і перебудову вторинного метаболізму модельних рослин на молекулярному рівні; показати відмінності впливу хітозанів різного біологічного походження на видовий склад мікобіоти філоплани, ризоплани і ризосфери суниці садової; встановити пролонговану антагоністичну дію комплексу хітозану з сорбіновою кислотою на фітопатогенні мікроорганізми.

**Оформлення дисертації** відповідає вимогам наказу МОН України №40 від 12.01. 2017 р., ілюстративний матеріал є інформативним і відображає експериментальні дані.

**Зміст автореферату** відповідає основним науковим положенням і змісту рукопису дисертаційної роботи.

Оцінюючи дисертаційну роботу О.В. Субіна у цілому, слід зазначити, що вона є логічно завершеним науковим дослідженням, яке відповідає сучасному методичному і теоретичному рівню. У процесі ознайомлення з текстом дисертаційної роботи сформульовано наведені нижче зауваження:

1. У кінці огляду літератури для логічного обґрунтування власних досліджень потрібно було дуже коротко підсумувати досягнення сучасної науки за обраною дисертантом темою і виокремити ті проблеми, що лишилися поза увагою інших вчених або досліджені недостатньо.

2. Докладний опис методичної частини проведення експериментів, присвячених адаптації рослин *Nicotiana tabacum* (розділ 3, с. 80) та визначенню ступеня деацетилювання і моносахаридного складу хітозанів різного походження (розділ 4, с. 86 і 90) потрібно перенести до розділу 2 «Матеріали і методи досліджень».

Результати дисертаційної роботи О.В. Субіна піднімають важливі наукові проблеми, що пов'язані з взаємним впливом рослин і мікроорганізмів та їх реакції на фактори біотичного і абіотичного стресу. Тому хотілося б почути думки Олександра Володимировича щодо таких дискусійних питань:

1. У представленій роботі Ви дослідили фізико-хімічні та еліситорні властивості хітозанів, що виділені з базидієвих грибів і комах. В огляді літератури Ви згадуєте про хітозани, що ізольовані з панцирів ракоподібних. Що відомо, за даними вітчизняних і зарубіжних вчених, про молекулярну масу, ступінь деацетилювання і біологічну активність хітозанів ракоподібних?

2. На молекулярному рівні Вами встановлено яким чином відбувається індукція хітозанами грибного походження системної стійкості рослин до дії патогенів. Але існує й інша група мікроорганізмів, яка формує з рослинами



взаємовигідні мутуалістичні відносини – ендوفіти, мікоризи. Чи є відомості у сучасній літературі про механізм розпізнавання мікроорганізму як симбіонта?

3. Відомо, що висока біорізноманітність мікробіоти у будь-якій екосистемі є ознакою сприятливої екологічної ситуації. При цьому на патогенні мікроорганізми діють їх природні антагоністи, зокрема, види родів *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chaetomium* тощо. Крім того, представники родів *Fusarium* і *Alternaria* не є облигатними фітопатогенами і впродовж свого життєвого циклу також існують у ґрунті як сапротрофи. Тому наскільки доцільно вносити препарати хітозану прямо у ґрунт? Можливо краще обмежитись обробкою листя чи здійснювати попередню обробку.

**Загальна оцінка дисертаційної роботи.** Зроблені зауваження свідчать про важливість і складність завдань, які вирішує дисертаційна робота О.В. Субіна, і жодним чином не впливають на її загальну позитивну оцінку.

Вважаю, що дисертаційна робота «Індукована стійкість суниці садової (*Fragaria ananassa* Duch.) проти основних фітопатогенів» є завершеною науковою роботою. За своєю актуальністю, науковою новизною і практичним значенням отриманих результатів, обґрунтованістю висновків дисертація відповідає вимогам п. 10 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567 зі змінами, затвердженими Постановами кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015, №1159 від 30.12.2015, №567 від 27.07.2016, №943 від 20.11.2019 та №607 від 15.07.2020, а її автор Олександр Володимирович Субін заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 06.01.11 «Фітопатологія».

Офіційний опонент,  
Завідувач відділу фізіології та  
систематики мікроміцетів  
Інституту мікробіології і вірусології  
ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник



І.М. Курченко

Підпис Курченко І.М.  
засвідчено  
завідувачем канцелярії Коваль Р.В.

