

## ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу ГОРЕЛОВОЇ ОЛЕНИ ІВАНІВНИ «**Антиоксидантна і осмопротекторна системи злаків при адаптації до гіпотермії**», представленої на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія»

*Актуальність теми дисертаційної роботи та її зв'язок з науковими програмами, планами, темами.* Низькі температури є одним з найбільш вагомих несприятливих чинників, що негативно впливають на життєдіяльність рослин і знижують врожайність сільськогосподарських культур, зокрема озимих злаків. В Україні втрати врожаю озимини внаслідок зимового вимерзання в окремі роки можуть перевищувати одну третину валового збору. Середні річні втрати врожаю зернових через заморозки в Австралії оцінюють в 360 млн. доларів США (Zheng et al., 2015). При цьому, починаючи з 1960 року, відзначається збільшення тривалості періоду весняних заморозків на один місяць і ризиків втрати врожаю від дії негативних температур. Причиною цих змін вважається зростання нестабільності погоди, що є одним із наслідків глобального потепління. Тому дослідження впливу низьких температур на рослинні об'єкти, функціонування протекторних систем і можливості їх активування мають важливе господарське значення.

Пошкоджувальна дія низьких температур зумовлена порушеннями мембранних структур в клітинах, водного режиму і утворенням кристалів льоду, метаболічними порушеннями, що супроводжуються посиленням генерації токсичних активних форм кисню (АФК). Розвитку окиснювального стресу за гіпотермії в останні роки приділяється особлива увага, оскільки виявлено, що АФК є не лише суттєвим пошкоджувальним чинником, але також одним із ключових компонентів захисних систем завдяки своїм сигнальним функціям. Саме з контролем необхідного рівня АФК пов'язана важливість ролі антиоксидантної системи рослин, яка включає цілий комплекс ферментів і низькомолекулярних сполук-антиоксидантів. Активація антиоксидантних ферментів і накопичення в тканинах рослин низькомолекулярних сполук, що поряд з антиоксидантним проявляють осмопротекторний, мембранопротекторний і шаперонний ефекти (пролін, цукри, вторинні метаболіти та ін.) є характерним для низькотемпературного стресу. Проте чіткого зв'язку між окремими показниками стану антиоксидантної системи і морозостійкістю, який мав би універсальний характер хоча б у межах певної таксономічної групи рослин, зокрема злаків, не виявлено. Можна припустити, що його відсутність зумовлена багатокомпонентністю антиоксидантної і осмопротекторної систем, компоненти якої можуть перебувати у складній функціональній, в тому числі компенсаторній, взаємодії між собою, а тому для коректної оцінки стану

захисних систем необхідні комплексні інтегральні показники. Їх розробка могла би стати основою для створення нових підходів для оцінки морозостійкості і скринінгу донорів стійкості для потреб селекції.

Зважаючи на ключову роль сигнальних сполук в розвитку адаптивних процесів за умов стресу, індукування стійкості рослин з їх допомогою (праймування) розглядається перспективним технологічним прийомом для зниження втрат врожаю за несприятливих умов (Wang et al., 2017). Ефективними праймувальними агентами вважаються донори сигнальних молекул – газотрансмітерів – оксиду азоту (NO) і сірководню (H<sub>2</sub>S), а також стресовий фітогормон саліцилова кислота, проте їх вплив на морозостійкість рослин і перебіг процесу холодового загартування вивчено недостатньо.

В зв'язку з цим, дисертаційна робота О.І. Горелової, присвячена комплексній оцінці ролі компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур та дослідженню індукування цих систем дією екзогенних сигнальних молекул (газотрансмітерів, фітогормонів), є безумовно актуальною і має вагомим наукове і практичне значення.

Дисертаційна робота виконувалася в рамках науково-дослідних тем Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва: «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр., номер державної реєстрації 0117U002514) та «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (2017-2019 рр., номер державної реєстрації 0117U002427).

**Структура роботи.** Дисертаційна робота Горелової О. І. викладена на 165 сторінках (включно з анотаціями і списком опублікованих праць), результати досліджень представлені в таблицях і на рисунках. Дисертація має стандартну структуру і складається з переліку умовних скорочень, вступу, шести розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень, чотири експериментальні розділи), аналізу та узагальнення результатів досліджень і висновків. Список цитованої літератури налічує 295 джерел, з яких 248 англійськомовні.

**Вступ** до дисертації написаний відповідно до вимог МОН України. В ньому детально обґрунтовано актуальність теми, коректно сформульовано мету та завдання роботи, а також наведені найважливіші положення наукової новизни і практичного значення отриманих результатів та охарактеризовано особистий внесок здобувача.

**У Розділі 1** дисертаційної роботи – **Огляді літератури** – проаналізовано особливості впливу низьких температур і адаптивні реакції рослин на клітинному і субклітинному рівнях, детально розглянуто роль окиснювального стресу і активних форм кисню (АФК) в розвитку пошкоджень клітинних структур та формуванні стрес-протекторної

фізіологічної відповіді рослинних систем. Значна увага приділена висвітленню наявних в літературі даних щодо участі ферментативних і низькомолекулярних компонентів антиоксидантної і осмопротекторної систем, а також екзогенних сигнальних сполук – газотрансмітерів – та фітогормонів в адаптації рослин до низьких температур.

**У Розділі 2** охарактеризовано об'єкти і умови проведення досліджень, описані методи визначення біохімічних і фізіологічних показників. Використані в роботі методи є адекватними відносно поставлених задач, успішно апробованими в сучасній світовій практиці наукових досліджень.

**У Розділі 3** наведені результати порівняльних досліджень особливостей функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем етіюльованих проростків злакових культур – жита, тритикале і пшениці у фізіологічно нормальних умовах і після холодового загартування. Показано, що зазначені культури істотно різняться як за рівнем конститутивної і індукованої загартуванням морозостійкості, так і за ступенем участі різних компонент антиоксидантної та осмопротекторної систем в їх формуванні. Виявлено, що в жита морозостійкість більшою мірою визначається високою активністю пероксидази, вмістом проліну та антоціанів, у тритикале – підвищеним вмістом флавоноїдів і цукрів, а в пшениці на холодове загартування більше реагувала активність антиоксидантних ферментів – СОД і каталази. Відзначено особливу роль мультифункціональних захисних сполук проліну і розчинних вуглеводів в формуванні стійкості до негативних температур, які, ймовірно, забезпечують вищі показники стійкості жита і тритикале порівняно з пшеницею.

**Розділ 4** присвячено висвітленню результатів детального вивчення стану антиоксидантної системи при адаптації до гіпотермії сортів тритикале з різною морозостійкістю. У дослідженнях використовували два високоморозостійкі сорти Букет і Раритет так два менш морозостійкі Олександра та Підзимок харківський. Виявлено істотні відмінності у функціонуванні компонентів антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків сортів тритикале з різною морозостійкістю при холодovому загартуванні та встановлено залежність між морозостійкістю генотипу та станом антиоксидантної системи. Водночас, чітких зв'язків між величинами окремих показників стану антиоксидантної системи і морозостійкістю сортів тритикале виявлено не було, що спонукало автора досліджень до пошуку інтегральних показників, які були б комплексною характеристикою стану антиоксидантної та осмопротекторної систем в цілому.

Результати кореляційного аналізу зв'язків між окремими та інтегральними показниками стану антиоксидантної системи жита, пшениці і різних генотипів тритикале та морозостійкістю етіюльованих проростків і зелених рослин у фазі кушіння наведені в **Розділі 5**. Для коректності аналізу було проведено нормування показників морозостійкості етіюльованих проростків і зелених рослин, а також всіх досліджуваних показників стану

антиоксидантної системи до діапазону значень від 0 до 1. Встановлена тісна позитивна кореляція між інтегральним нормованим показником, що складався з суми нормованих величин активностей антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних протекторів у загартованих проростків злаків і морозостійкістю проростків ( $r = 0,94$ ,  $P \leq 0,01$ ) та рослин у фазі кущіння ( $r = 0,90$ ,  $P \leq 0,05$ ). Запропоновано використовувати цей інтегральний показник як маркер морозостійкості озимих злаків для виявлення стійких генотипів.

**Розділ 6** містить результати вивчення впливу донорів сірководню і оксиду азоту, а також комбінованої дії донора NO і саліцилової кислоти на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків злаків. Встановлено, що обробка проростків жита та пшениці донором сірководню NaHS поліпшує їх морозостійкість за відсутності загартування та підвищує ефект холодового загартування. Під впливом NaHS в проростках зростає вміст цукрів, проліну антоціанів і флавоноїдів, а також підвищувалась активність пероксидази, каталази та фенілаланінамонійліази. Показано, що праймування насіння жита і пшениці донором NO нітропрусидом натрію (НПН), саліциловою кислотою та їх сумішню підвищувало здатність проростків до холодового загартування, та встановлено посилення захисного ефекту при комбінованій обробці саліциловою кислотою з НПН. При цьому відзначено підвищення вмісту в загартованих проростках обох видів злаків низькомолекулярних протекторних сполук, активності СОД і пероксидази та зменшення накопичення МДА у проростках після їх проморожування, що вказує на послаблення розвитку окиснювального стресу у проростках після їх проморожування.

У заключній частині дисертаційної роботи – **Аналізі та Узагальненні результатів досліджень** – у стислому вигляді викладені найважливіші результати досліджень, на основі аналізу сукупності отриманих оригінальних експериментальних даних та відомостей, що є в світовій літературі, переконливо охарактеризовано тісний зв'язок між станом антиоксидантної і осмопротекторної систем зернових злаків і їх морозостійкістю, а також можливість посилення морозостійкості екзогенними донорами газотрансмітерів оксиду азоту і сірководню та фітогормоном саліциловою кислотою, які сприяють формування адаптивних реакцій рослин завдяки активації зазначених систем.

Завершується дисертація **Висновками**, коректно сформульованими дисертантом на основі отриманих оригінальних експериментальних даних.

**Наукова новизна результатів дослідження.** Дисертаційна робота є оригінальним дослідженням, в якому вперше проведено комплексні порівняльні дослідження ролі компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у рослин жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до негативних температур, а також індукування цих систем дією донорів газотрансмітерів NO і H<sub>2</sub>S і саліцилової кислоти. Встановлено міжвидові і

міжсортіві особливості формування морозостійкості за участі ферментативних та низькомолекулярних складових антиоксидантної та осмопротекторної систем. Вперше детально вивчено особливості функціонування стрес-протекторних систем різних сортів тритикале контрастних за морозостійкістю. Показано тісний зв'язок між формуванням морозостійкості рослин і станом антиоксидантної системи та розвитком окиснювального стресу. Вперше запропоновано використовувати для комплексної оцінки стану антиоксидантної системи злаків інтегральний нормований показник, що розраховується як сума нормованих величин активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних протекторних сполук, та на основі кореляційного аналізу показана висока тіснота зв'язку цього показника з морозостійкістю як загартованих етіологованих проростків, так і зелених рослин озимих злаків у фазі кущіння. Вперше встановлено позитивний вплив донора сірководню  $\text{NaHS}$  на стійкість проростків зернових злаків – озимих пшениці і жита – до дії негативних температур та показано роль окремих антиоксидантних ферментів, активації вторинного метаболізму, накопичення проліну і флавоноїдних сполук у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного сірководню. Вперше чітко показано, що підвищення морозостійкості озимих злаків внаслідок праймування насіння донором оксиду азоту нітропрусидом натрію, саліциловою кислотою та їх комбінацією пов'язано із зростанням активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних мультифункціональних протекторів.

***Практичне значення та шляхи використання результатів досліджень.*** Проведені дослідження поглиблюють існуючі уявлення про механізми формування морозостійкості злакових культур і є обґрунтованою теоретичною базою для розробки нових прийомів підвищення стійкості господарсько важливих рослин до дії низьких температур, та нових методів відбору морозостійких генотипів в процесі селекції. Отримані результати дозволяють стверджувати, що комплексна оцінка стану антиоксидантної та осмопротекторної систем на основі інтегральних нормованих показників може слугувати маркером морозостійкості генотипів злакових культур, а застосування донорів газотрансмітерів  $\text{NO}$  і  $\text{H}_2\text{S}$  і саліцилової кислоти може поліпшувати стійкість рослин до негативних температур.

Результати досліджень можуть бути використані при викладанні курсів фізіології і екології рослин в класичних університетах, аграрних і педагогічних вищих навчальних закладах та вже використовуються у навчальному процесі в ХНАУ ім. В.В. Докучаєва і ХНУ ім. В.Н. Каразіна, а також при проведенні фундаментальних і прикладних досліджень в галузі фізіології стійкості рослин.

***Ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків.*** Дисертаційна робота базується на достатньо великому масиві оригінальних

експериментальних даних, отриманих завдяки ретельно продуманим і логічно спланованим експериментам. Методичні прийоми, біохімічні і математичні методи, використані в роботі, повністю узгоджуються з контекстом сучасних досліджень у галузі біології стійкості рослин. Достовірність результатів не викликає сумніву, а їх інтерпретація є коректною і виваженою. Досліди проведені з достатньою кількістю повторень, дані математично опрацьовані з використанням адекватних загальноприйнятих методів. Сформульовані висновки є добре обґрунтованими і відповідають вказаним меті та завданням дослідження.

**Повнота викладу основних результатів у опублікованих наукових працях.** За темою дисертації опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 9 статей у провідних фахових виданнях України та інших країн, з них дві у журналах, що входять до наукометричної бази Scopus. Публікації повністю відображають основні матеріали і положення, що представлені в дисертації. Результати досліджень пройшли широку апробацію на багатьох міжнародних та вітчизняних симпозиумах, з'їздах і конференціях.

**Відповідність вимогам академічної доброчесності.** Текст дисертаційної роботи та представлені експериментальні результати не мають ознак плагіату та академічної недоброчесності. Наукові дані, отримані іншими дослідниками, наведені в тексті дисертації з відповідними посиланнями на літературні джерела.

Ознайомлення з матеріалами дисертації О. І. Горелової дає підстави вважати, що дисертантом виконана вагома науково-дослідна робота, в результаті якої отримані достовірні ґрунтовні результати, які істотно поглиблюють існуючі уявлення щодо ролі антиоксидантної і осмопротекторної системи в адаптації рослин, зокрема злаків, до гіпотермії. Дисертаційна робота О. І. Горелової є самостійним дослідженням, виконаним на високому методичному та науковому рівні. Вона є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати, що мають важливе теоретичне і практичне значення.

Загалом у представленій роботі не виявлено суттєвих недоліків. Водночас слід відзначити деякі упущення та огріхи редакційного характеру:

1. В тексті дисертації зустрічається багато технічних друкарських помилок.

2. В Анотації вжита неправильна назва м'якої пшениці англійською мовою – «soft wheat» замість «common (bread) wheat» (стор. 7).

3. Некоректним є твердження на стор. 35 – «При низькій температурі дисбаланс між потужністю для збору світлової енергії і здатністю розсіювати цю енергію шляхом метаболічної активності викликає перезбудження фотосистеми II ...». При фотосинтезі метаболічна активність спрямована на конверсію і засвоєння світлової енергії, а її надмір, головним

чином, розсіюється шляхом випромінювання молекулами хлорофілу квантів енергії в тепловому діапазоні.

4. У Розділі 2 пропущена характеристика сорту жита Пам'ять Худоєрка.

5. В тексті дисертації не вказано, який сорт тритикале був використаний для порівняльних досліджень злакових культур, представлених в Розділі 3.

6. Не на всіх рисунках і в таблицях є позначення статистичної достовірності відмінностей між варіантами

7. У вступній частині Розділу 4 (стор. 75) сорт тритикале Олександра охарактеризовано як озимий, а в Анотації, Розділі 2, табл. 5.1 він зазначений як дворучка.

8. Твердження, що «Праймування насіння НПН в концентраціях діапазону 0,1–0,5 мМ підвищувало морозостійкість обох злаків» на стор. 113 потребує уточнення, що мова йде про загартовані проростки. У наступному абзаці, де наведені результати досліджень впливу «виснаженого» НПН, також, очевидно, йдеться про загартовані проростки, але в тексті це не вказано.

9. В тексті дисертації недостатньо чітко обгрунтовано, чому в дослідженнях для порівняння 10-денних загартованих етіюльованих проростків як контроль використовували 4-денні незагартовані проростки.

Водночас, зазначені недоліки не знижують загальної високої оцінки наукового значення роботи, вагомості її результатів та обгрунтованості висновків.

**Висновок.** Підсумовуючи викладене, вважаю, що тема і зміст дисертації Горелової Олени Іванівни «Антиоксидантна і осмопротекторна системи злаків при адаптації до гіпотермії» відповідають спеціальності 091 – «Біологія» галузі знань 09 – «Біологія» та вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 6 березня 2019 року, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія».

Офіційний опонент,  
доктор біологічних наук,  
член-кореспондент НАН України,  
завідувач відділу фізіології та  
екології фотосинтезу  
Інституту фізіології рослин і  
генетики НАН України

О.О. Стасик

