

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Шклярєвського Максима Анатолійовича
на тему «**Функціональна взаємодія фітогормонів і газотрансмітерів при
адаптації рослин до абіотичних стресорів**»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи

Регуляторна роль газотрансмітерів не обмежується тваринним світом, а виявляється також у рослинах і, напевне, є загальнобіологічним явищем. Так, ключові газотрансмітери NO, CO і H₂S беруть участь у регуляції функціонування продихового апарату листків, здатні впливати на процеси редокс-регуляції у рослинних клітинах. Крім того, оксид азоту шляхом взаємодії із сфінголіпідами бере участь у передачі сигналу в рослинах і, напевне, в усіх еукаріотних клітинах. Для рослинних клітин відносно детально досліджена лише роль NO як сигнального посередника. Стосовно ролі монооксиду вуглецю в регуляції функцій рослинного організму описані ефекти на дію зневоднення і засолення, але мало досліджена роль CO в адаптації рослин до стресових температур, а дані ж про вплив донорів CO на теплостійкість інтактних рослин донедавна були взагалі відсутні. Відкритим є питання про роль інших компонентів сигнальної мережі в реалізації стрес-протекторної дії монооксиду вуглецю.

Зважаючи на це, дисертаційне дослідження Шклярєвського М.А., спрямоване на з'ясування ефектів функціональної взаємодії ключових газотрансмітерів (NO, H₂S, CO) між собою, з іншими сигнальними посередниками та окремими компонентами гормональної системи рослин за умов адаптації рослин до гіпертермії і сольового стресу, без сумніву є актуальним.



Результати досліджень впливу донора СО геміну на теплостійкість проростків пшениці та функціонування їх антиоксидантної системи, встановлення участі АФК, іонів кальцію та NO у реалізації стрес-протекторної дії СО, доведення участі сірководню у реалізації стрес-протекторної дії саліцилової кислоти на проростки пшениці за умов гіпертермії, виявлення ролі компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів за дії сольового стресу мають наукову новизну, теоретичне і практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційні дослідження виконувалися в межах двох науково-дослідних тем кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В.Докучаєва – «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (№ держреєстрації 0117U002427; Згідно з наказом Міністерство освіти і науки України № 198 від 10.02.2017) та «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр.) (№ держреєстрації 0117U002514), а також гранту за програмою «Grants for Multidisciplinary research teams 2020 of Ministry of Foreign Affairs of the Czech Republic. Direction curator – Czech University of Life Science, Prague» (проєкту Czech Republic Development Cooperation «Платформа AgriSciences для розвитку науки у вищих навчальних закладах України»).

Наукова і практична новизна отриманих результатів.

У дисертації вперше одержані такі нові наукові результати:

1. Встановлено ефект індукування розвитку теплостійкості інтактних рослин (проростків пшениці) дією донора монооксиду вуглецю (геміну) і досліджено участь АФК, іонів кальцію та оксиду азоту в реалізації стрес-протекторних ефектів СО.
2. Встановлено, що найбільш раннім ефектом, який відбувається за впливу донора СО на клітини коренів проростків, є кальційзалежне

зростання вмісту NO, асоційоване зі збільшенням активності нітратредуктази.

3. Доведено причинно-наслідковий зв'язок між зростанням вмісту H₂S, підвищенням активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази, гваяколпероксидази) в коренях проростків пшениці та розвитком їх теплостійкості за дії саліцилової кислоти.
4. Досліджено комбінований вплив стресового фітогормону 24-епібрасиноліду і донора сигнальної молекули NO нітропрусиду натрію (НПН) на теплостійкість проростків пшениці і стан їх антиоксидантної системи і встановлено ефект синергізму в дії низьких концентрацій фітогормону і донора оксиду азоту.
5. З використанням мутантів арабідопсису *coil* і *jin1* вперше експериментально доведено, що ключові білки жасмонатного сигналінгу залучені в реалізацію протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю за умов сольового стресу.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в тому, що комбіноване застосування саліцилової кислоти і донорів сірководню, а також брасиностероїдів і донорів оксиду азоту, дає можливість посилити стрес-протекторний вплив екзогенних фітогормонів на рослини. Модифікований протокол вирощування рослин арабідопсису у малооб'ємній водній культурі може бути цінним для фундаментальних досліджень та практичного скринінгу біологічної активності природних і синтетичних сполук різної природи.

Отримані дані розширюють фундаментальні знання про механізми функціональної взаємодії між сигнальними посередниками-газотрансмітерами та окремими стресовими фітогормонами і можуть бути використані під час викладання загальних і спеціальних курсів з фізіології і біохімії рослин в класичних, аграрних і педагогічних ЗВО, а також при проведенні досліджень у галузі фізіології стійкості рослин.

Повнота викладення наукових положень, результатів і висновків роботи в опублікованих працях.

За матеріалами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з яких 8 статей у фахових виданнях України та інших країн, з них 3 у журналах, що входять до наукометричної бази SCOPUS, а також тези доповідей у збірниках матеріалів і праць міжнародних наукових конференцій. Одержані дисертантом основні експериментальні дані добре відображені у публікаціях.

Оцінка змісту дисертаційної роботи та її завершеності.

Дисертація викладена на 185 сторінках комп'ютерного набору, складається зі вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис методів досліджень та використаних об'єктів, три експериментальні розділи), висновків та списку бібліографічних посилань, що включає 314 джерел. Дисертаційна робота ілюстрована 31 рисунком, 3 таблицями і 2 схемами.

В анотації наведено узагальнений виклад основного змісту дисертації, результати дослідження, наукова новизна та практичне значення роботи.

У вступі обґрунтовано актуальність теми дисертації, її зв'язок з науковими темами, сформульовані мета роботи та завдання для її досягнення.

Огляд літератури присвячено аналізу сучасного стану досліджень механізмів впливу ключових сигнальних речовин, зокрема газотрансмітерів, а також ряду фітогормонів на формування адаптивних реакцій рослин на дію стресорів. Огляд охоплює велику кількість джерел літератури, переважна більшість з яких – публікації останнього десятиліття.

В розділі 2 «Матеріал, умови і методи досліджень» описано об'єкти досліджень, схеми дослідів, методики аналізів. Перелік сучасних біохімічних, спектрофотометричних, статистичних методів вказує на адекватність вибору методичних підходів і достовірність отриманих результатів.

Розділ 3 «Монооксид вуглецю і адаптація рослин до гіпертермії» присвячено аналізу феноменології впливу донора СО геміну на теплостійкість проростків пшениці та з'ясуванню механізмів стрес-

протекторної дії екзогенного монооксиду вуглецю. Дисертантом отримано дані про підвищення виживаності проростків за впливу найбільш ефективної концентрації – 5 мкМ. Інгібіторним методом показано, що стрес-протекторні ефекти геміну пов'язані з його дією саме як донора СО і ця дія специфічна. Показано, що обробка проростків геміном викликала підвищення активності СОД, каталази, гваяколпероксидази у коренях через 24 год. Виявлено можливий причинно-наслідковий зв'язок між активацією під впливом обробки геміном (донором СО) позаклітинної пероксидази і підвищенням вмісту пероксиду водню у коренях. Показано, що підвищення активності позаклітинної пероксидази, що відбувається під впливом донора СО, є кальцій-залежним процесом, оскільки усувається як хелатором кальцію ЕГТА, так і інгібітором виходу кальцію в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів неоміцином.

Виявлено досить швидко (а саме протягом перших двох годин інкубації на середовищі з донором СО геміном) транзиторне підвищення вмісту NO в коренях проростків пшениці, що характерно для його сигнальних ефектів. Розглянуто роль нітратредуктази, як основного ферменту, що забезпечує генерацію оксиду азоту в клітинах коренів при дії донора СО, а збільшення її активності залежить від кальцієвого гомеостазу. Встановлено, що в сигнальній мережі, яка стимулюється монооксидом вуглецю, NO знаходиться вище від пероксиду водню. На це вказують більш швидке утворення NO у коренях пшениці при обробці геміном порівняно з динамікою зміни вмісту H_2O_2 , а також результати інгібіторного аналізу. Це дозволило дисертанту зробити висновок, що розвиток сигнальних подій у клітинах проростків пшениці у присутності донора СО геміну можна представити так: вплив СО \rightarrow підвищення $[Ca^{2+}]_{цит}$ \rightarrow активація НР \rightarrow підвищення вмісту NO \rightarrow активація позаклітинної пероксидази \rightarrow підвищення вмісту H_2O_2 \rightarrow активація антиоксидантної та інших протекторних систем \rightarrow розвиток теплостійкості.

У розділі 4 «Участь газотрансмітерів у реалізації стрес-протекторної дії на рослини саліцилової кислоти і 24-ЕБЛ за умов гіпертермії» автором

встановлено, що стрес-протекторна дія фітогормонів саліцилової кислоти і 24-епібрасиноліду може бути підсилена їх застосуванням у поєднанні з донорами газотрансмітерів – сірководню і оксиду азоту, відповідно. При цьому донори газотрансмітерів у низьких концентраціях разом з фітогормонами посилювали вплив останніх на одну з ключових захисних систем клітин – антиоксидантну.

У розділі 5 «Роль компонентів жасмонатного сигналіngu в реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів за дії сольового стресу на рослини арабідопсису» автором з використанням мутантів арабідопсису, дефектних за певними компонентами жасмонатного сигналіngu (мутанти *coi1* та *jin1*), показано значення компонентів жасмонатного сигналіngu (білків COI1 і JIN1/MYC2) в реалізації стрес-протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю на солестійкість рослин дикого типу.

Короткий розділ «Узагальнення результатів» містить наочні схеми, що відображають участь сигнальних посередників в реалізації впливу екзогенного монооксиду вуглецю на теплостійкість рослин та залучення жасмонатного сигналіngu в реалізацію стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів. Ці схеми ґрунтуються переважно на експериментальних результатах автора.

У висновках чітко сформульовано основні результати роботи.

Отже, дисертаційна робота Шкляревського Максима Анатолійовича є завершеним науковим дослідженням, що має наукову новизну та практичне значення.

Питання і зауваження до дисертаційної роботи

1. У підрозділі 3.2. автор стверджує, що абсолютні величини активності пероксидази у випадку з обробкою проростків геміном були достовірно вищі, ніж у відповідному контролі, але в таблиці 3.1 це не позначено. Те ж саме стосується і каталази.

2. В ході досліджень можливої ролі надходження кальцію з позаклітинного простору і внутрішньоклітинних компартментів у цитозоль в регуляції активності позаклітинної пероксидази і вмісту пероксиду водню у коренях за дії на них геміну, доцільно було б визначити вміст іонів кальцію у контролі та у варіанті з додаванням геміну.

3. Чи достатнім є показник виходу речовин після прогріву для твердження про мембрано-протекторну дію донора СО (рис. 3.8, а), в огляді літератури на це теж немає посилань.

4. Підписи рисунків 4.1. та 4.3. не зовсім коректні, створюється враження, що виживаність і теплостійкість це терміни синоніми.

5. У роботі подекуди трапляються орфографічні помилки та редакційні огріхи.

Наведені вище зауваження не зменшують наукову цінність дисертації Шклярєвського М.А. і не впливають на її позитивну оцінку.

Відсутність порушення академічної доброчесності

В результаті всебічного аналізу тексту дисертації не було виявлено порушення автором вимог доброчесності. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Для всіх публікацій у співавторстві чітко зазначено особистий внесок дисертанта.

Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

Висновок

Аналіз представлених до розгляду матеріалів та положень дисертаційної роботи «Функціональна взаємодія фітогормонів і газотрансмітерів при адаптації рослин до абіотичних стресорів», свідчить, що за обсягом, науковою новизною, теоретичним і практичним значенням

робота відповідає вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 р., а її автор – Шклярєвський Максим Анатолійович, безумовно заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент
кандидат біологічних наук, доцент
кафедри молекулярної біології та біотехнології
біологічного факультету Харківського
національного університету імені В.Н. Каразіна *А.В.* А.В. Голтвянський

Підпис А.В. Голтвянського засвідчую:

16.08.2021 р.



А.В. Голтвянський