

РЕЦЕНЗІЯ

кандидата біологічних наук, доцента

Рожкова Романа Вікторовича

на дисертаційну роботу

Тарабана Дмитра Анатолійовича

на тему: **“Сигнальні протекторні ефекти меланіну у рослин за дії абіотичних стресорів”**,

подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії

за спеціальністю 091 – Біологія

в галузі знань 09 – Біологія

Актуальність теми досліджень.

В умовах глобальних змін клімату, що супроводжуються різкими змінами температур, частими посухами, та погіршенням стану ґрунтів, через обмежений адаптивний потенціал сучасних сортів основних с.-г. культур, загострилась проблема з отриманням надійних врожаїв належної якості, що загрожує не лише економічними збитками, але і створює ризики продовольчій безпеці загалом. За останніми підрахунками, до 50 % втрат врожаю пов'язано саме з абіотичними чинниками довкілля. Одним із перспективних шляхів у вирішенні цієї проблеми є впровадження фізіологічних підходів, які базуються на використанні широкого арсеналу фітогормонів і їх синтетичних аналогів, сигнальних посередників та стресових метаболітів.

Серед фізіологічно активних речовин особлива роль відводиться мелатоніну (N-ацетил-5-метокситриптамін), який бере участь у регуляції ключових сигнальних шляхів, зокрема кальцієвих і АФК-залежних каскадів, взаємодіє з іншими сигнальними молекулами, зокрема, такими як оксид азоту (NO) та сірководень (H_2S); а також сприяє підвищенню стійкості рослин до абіотичних стресорів різної природи. Підвищення стійкості рослин до абіотичних стресорів під впливом мелатоніну пов'язано з його здатністю індукувати експресію генів антиоксидантних ферментів, а також впливати на синтез низькомолекулярних антиоксидантів. У цілому стрес-протекторні ефекти мелатоніну зумовлені його залученням до складної сигнальної мережі рослинних клітин.

Разом з тим, причинно-наслідкові зв'язки між можливими змінами кальцієвого гомеостазу та генерацією АФК та формуванням стійкості рослин до високих температур під впливом мелатоніну досі залишалися практично не дослідженими. Мало досліджені і видові особливості стрес-протекторного впливу мелатоніну на зернові злаки, зокрема, на стадії проростання зернівок. Таким чином, можна сказати, що, загалом, потенціал мелатоніну як молекули, що синтезується рослинами і виконує важливі регуляторні і стрес-протекторні функції, досліджений недостатньо. Тому, вивчення сигнальних і протекторних функцій мелатоніну, яким і було присвячене дослідження Тарабана Д. А., є виключно актуальною задачею, вирішення якої сприятиме розробці нових агротехнологій, що дозволять підвищити стійкість

сілськогосподарських культур до стресів і зменшити втрати врожаю в умовах змін клімату.

Дисертаційні дослідження виконувалося в рамках теми НДР кафедри землеробства та гербології ДБТУ «Регуляція адаптивних реакцій рослин з участю активних форм кисню і азоту та нейромедіаторів» (№ держреєстрації 0123U100582) та проєктів 14.00.02.05Пк «Розроблення тест-системи для скринінгу стрес-протекторної дії нових фізіологічно активних речовин на зернові злаки» (№ держреєстрації 0123U100486) і 14.00.02.06П «Розробка методів праймінгу насіння зернових злаків дією донорів газотрансмітерів та сполук з гормональною активністю» (№ держреєстрації 0124U000126), згідно з Договором про наукову співпрацю між Державним біотехнологічним університетом та Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України.

Особистий внесок автора в отримання наукових результатів, поданих в роботі.

Особистий внесок автора полягає в опрацюванні літературних джерел, освоєні відповідних методів досліджень та проведенні всіх необхідних експериментів. Отримані результати інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за безпосередньої участі наукового керівника. Частина експериментів проведена в кооперації із співробітниками Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН д.б.н. Ю. Є. Колупаєвим і к.б.н. Т. О. Ястреб. Частка особистої участі здобувача становить понад 70 %. Всі сформульовані в дисертації твердження і висновки мають оригінальне обґрунтування та пояснення сформульовані Тарабаном Д. А. особисто.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій.

Теоретичні положення та узагальнення наведені в представленій роботі здобувача здійснені з дотриманням всіх методичних вимог, що висувуються до такого роду лабораторних досліджень та обґрунтовані і підтверджені з використанням відповідної статистичної обробки результатів за допомогою сучасного програмного забезпечення.

Обсяг вибірки по кожному з досліджуваних зразків складав не менше 30 рослин, досліди проведені в 4 – 5 кратній повторності, а результати досліджень оброблені і візуалізовані з використанням широкого арсеналу статистичних методів в програмах Statistica (версія 10.0) та Microsoft Excel. Публікації результатів досліджень у провідних фахових виданнях України та виданнях, що входять до переліку Scopus також свідчать про обґрунтованість та достовірність одержаних результатів.

Наукове значення отриманих результатів.

Автором вперше досліджено причинно-наслідкові зв'язки між змінами кальцієвого гомеостазу, генерацією АФК та формуванням індукованої мелатоніном теплостійкості рослин (на прикладі проростків пшениці). З використанням інгібіторного аналізу та прямих методів оцінки генерації

АФК було встановлено, що розвиток теплостійкості проростків і активація їх ферментативної антиоксидантної системи під впливом мелатоніну можливі лише за умови посилення генерації АФК, пов'язаного з підвищенням активності НАДФН-оксидази. Водночас посилення генерації АФК клітинами відбувається за умови надходження іонів Ca^{2+} з позаклітинного простору та внутрішньоклітинних компартментів.

Також вперше проведено порівняльне дослідження дії мелатоніну на стійкість *Triticum aestivum* і *Secale cereale* до впливу високої температури у поєднанні з низькою вологістю повітря і встановлено видові особливості прояву стрес-протекторних ефектів мелатоніну. Показано, що жито, як вид зернової культури з вищою стійкістю до абіотичних стресорів, в порівнянні з пшеницею, менше реагує на передобробку мелатоніном.

За умов модельної посухи, яка створена з використанням ПЕГ 6000, виявлено сортові особливості стрес-протекторної дії мелатоніну на проростки пшениці. Показано більш помітний прояв захисних ефектів мелатоніну у сорту з нижчою посухостійкістю.

В дослідженнях Тарабана Д. А. вперше встановлено здатність мелатоніну посилювати проростання старих зернівок жита і тритикале і зменшувати прояв окиснювального стресу, яким супроводжується процес проростання зернівок. Виявлені ефекти підвищення активності СОД і каталази, а також вмісту антоціанів у проростках обох видів і зростання активності гваяколпероксидази у тритикале.

Практичне значення одержаних результатів.

Насамперед, авторами досліджень доведена можливість підвищення стійкості зернових злаків до абіотичних стресів шляхом праймінгу насіння розчинами мелатоніну. Ця процедура передбачає відносно короткочасне замочування насіння у розчинах мелатоніну з подальшим висушуванням до вихідного стану, що робить її доступною для практичного використання. Також, як свідчать одержані результати, позитивний вплив праймінгу мелатоніном на проростання зернівок злаків з низькими посівними якостями, дозволяє практично використовувати цей метод для відновлення посівних якостей насіння в селекційних та наукових установах, зокрема при роботі з колекційними зразками. Результати досліджень можуть стати основою для розробки спеціальних технологій праймінгу насіння мелатоніном з метою поліпшення проростання насіння за стресових умов і підвищення стійкості рослин на ранніх фазах розвитку.

Результати роботи мають суттєве практичне значення і можуть бути використані у наукових установах НАН України і НААН України, які проводять дослідження у галузі стійкості рослин і займаються розробкою агробіотехнологій підвищення стійкості рослин і посівних якостей насіння. Отримані результати можна рекомендувати для впровадження у навчальні програми закладів вищої освіти для підготовки фахівців у галузі біології, біотехнології, агрономії та охорони навколишнього середовища, зокрема, при

викладанні курсів «Фізіологія і біохімія рослин» та спеціальних курсів, пов'язаних зі стійкістю рослин.

Висновок про повноту опублікування основних положень дисертації.

Результати проведених експериментальних та теоретичних досліджень достатньо повно викладені в 14 опублікованих наукових працях, з яких 4 статті у виданнях, що індексується в наукометричній базі Scopus; дві статті в провідних фахових виданнях України, глава в монографії, проіндексованій у наукометричній базі Scopus, а також опубліковано 7 тез доповідей та матеріалів у збірниках конференцій.

Аналіз основного змісту роботи.

У *вступній* частині автор обґрунтовує актуальність теми досліджень, описує зв'язок роботи з науковими програмами і планами, формулює мету предмет, об'єкт та основні завдання досліджень, представляє методи досліджень, вказує на наукову новизну та практичну значущість отриманих результатів; наводить перелік умовних скорочень використаних в дисертації, представляє наукові публікації підготовлені за темою дисертаційної роботи та зазначає конференції на яких було апробовано результати досліджень.

В *першому* розділі наведено теоретичне узагальнення ролі мелатоніну в стрес-протекторних реакціях клітини на дію несприятливих чинників довкілля. Зокрема, проводиться аналіз інформаційних джерел, щодо прямої антиоксидантної дії мелатоніну, його здатності впливати на експресію генів, що беруть участь у синтезі захисних ферментів, а також залучення мелатоніну до процесів АФК та NO-сигналіngu шляхом прямої взаємодії з цими молекулами та впливу на системи їх генерації.

В *другому* розділі наводиться опис вихідного матеріалу та методики досліджень, якими послуговувався здобувач при постановці експерименту. Зокрема, дослідження проводились з використанням трьох зернових культур: трьох сортів пшениці та по одному сорту жита і тритикале. Ретельно описана підготовка матеріалу для досліджень, умови постановки експерименту, варіанти дослідів та проведено ретельний аналіз результатів дослідження за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками та властивостями. Результати отриманих досліджень обґрунтовані з використанням стандартних методів статистичного аналізу та візуалізовані з використанням сучасних комп'ютерних програм.

В *третьому* розділі наводяться результати досліджень за проростками пшениці і жита вирощених в умовах модельної посухи та наочно продемонстрований позитивний протекторний вплив на розвиток проростків обробки мелатоніну. Буди підібрані оптимальні концентрації мелатоніну, які виявили максимальний позитивний ефект на розвиток і виживаність проростків. Показано, що найбільш виразно захисний вплив мелатоніну виявляється на зразках найчутливіших до посухи.

В *четвертому* розділі представлені результати вказують на залучення АФК та іонів кальцію в реалізацію стрес-протекторної дії мелатоніну або продуктів його перетворення: вплив мелатоніну на виживаність проростків після впливу ушкоджувального прогріву усувався антиоксидантом ДМТС, інгібітором НАДФН-оксидази імідазолом, хелатором позаклітинного кальцію ЕГТА та інгібітором фосфоліпази С неоміцином. Зазначені сполуки також нівелювали вплив обробки проростків мелатоніном на активність антиоксидантних ферментів. Порівняння впливу праймінгу насіння мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита виявило наявність видових відмінностей його ефектів. На проростки жита мелатонін впливав менш помітно, ніж на проростки пшениці.

П'ятий розділ присвячений праймінгу зернівок пшениці мелатоніном за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) і сольового стресу, який сприяв підвищенню схожості насіння, посилював ріст проростків, а також збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів. При цьому обробка мелатоніном пом'якшувала спричинюване стресами інгібування амілази і сприяла накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Водночас обробка мелатоніном сприяла збільшенню активності одного з ключових антиоксидантних ферментів – каталази. Також було показано, що короткочасна обробка зернівок пшениці розчинами мелатоніну з наступним висушуванням до вихідної вологості може бути практичним інструментом для підвищення схожості насіння і стійкості рослин до стресів, що спричиняють зневоднення. За результатами досліджень показано, що однією з причин підвищення схожості старого насіння тритикале та жита під впливом мелатоніну може бути пом'якшення окислювального стресу, що супроводжує проростання насіння.

Висновки включають підсумки та узагальнення результатів дослідження.

Оцінка структури дисертації, мови та стилю викладання.

Представлена на розгляд наукова праця містить анотацію українською та англійською мовами, перелік наукових праць опублікованих за темою дисертаційних досліджень, вступ, п'ять розділів, висновки до кожного розділу та загальні висновки по роботі, список використаних джерел. Загальний обсяг 169 сторінок комп'ютерного тексту, містить 4 таблиці та 29 рисунків, список цитованих джерел включає 208 найменувань, причому всі написані латиницею.

Дисертація написана гарною українською мовою з використанням сучасної термінології, що використовується в фізіології та біохімії рослин. Викладення матеріалу цілком відповідає змісту та вимогам, що висуваються до дисертаційних робіт і в повній мірі висвітлює результати наукових досліджень.

Зауваження щодо змісту дисертації.

Не зважаючи на доволі високий рівень викладення результатів проведених досліджень, до представленої на розгляд дисертаційної роботи виникли наступні зауваження і побажання:

1. Не достатньо поясненим є вибір дисертантом вихідних для досліджень сортів пшениці. Добре відомо, що західноєвропейські сорти, до яких належать і використані в роботі сорти німецького походження Tobak та Etana, є високо інтенсивними сортами з високим потенціалом продуктивності, але з обмеженим адаптивним потенціалом, що й обумовлює їх поширення, переважно в Поліссі та Західному Лісостепу України, де загалом спостерігаються більш м'які кліматичні умови. В цьому випадку авторам для подальших досліджень варто рекомендувати більше звернути увагу на сорти вітчизняної селекції, що походять з південних селекційних центрів України (Одеса, Херсон, Донецьк). Також, для подальшої роботи і для глибшого розуміння адаптивності сортів до посухи можна рекомендувати залучення до вивчення не лише інтенсивні і напівінтенсивні селекційні сорти, а й місцеві сорти екстенсивного типу, а можливо, для порівняння залучити й видове різноманіття пшениці: *T. monoccum*, *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. spelta*, *T. sphaerococcum*, *T. compactum*, тощо.

2. За результатами проведених дисертантом досліджень місцевий селекційний сорт Досконала віднесений до слабо посухостійких, проте за нашими спостереженнями в посушливих умовах 2023 р. цей сорт за поєднанням густоти стеблестою (500 стебел на 1м²) і масою зерна з колосу (2,42 г) віднесений нами до посухостійких сортів. Як Ви це поясните?

3. В анотації та в останньому пункті висновків до дисертації здобувач використовує термін '*прискорене старіння насіння*', однак ні в методиці, ані в тексті дисертації розгорнутого пояснення цього терміну не наведено. Між тим, методика прискореного старіння насіння відома досить давно (Ліхачов, 1980) і її широко використовують в насіннізнавстві. Тож не зрозуміло, чи послуговувався дисертант цією методикою чи подібними до неї? Якщо так, то про це варто було написати, якщо ні, то вважаю, що цей термін потрібно було більш детально описати.

4. На ст. 87 дисертації є посилання (Gong et al., 2017), що мелатонін сприяє активації експресії генів БТШ у томатів, але пояснення, які це саме гени в роботі відсутнє, що ускладнює сприймання інформації.

5. В роботах авторів, на яких посилається здобувач, є свідчення того, що мелатонін впливає на накопичення проліну, проте в своїй дослідженнях дисертант подібного ефекту не спостерігає. Відсутність такого впливу мелатоніну потребує пояснення.

6. Як видно з отриманих результатів, встановлені дисертантом оптимальні концентрації мелатоніну при обробці насіння є достатньо ефективними для підвищення стресостійкості зернових культур. Тому, вважаю, що авторам слід було б подати документи на отримання патенту на свої дослідження та підготувати методичні рекомендації стосовно цього питання, що істотно посилило практичну значущість одержаних результатів.

Втім, висловлені зауваження на зазначені помилки і дискусійні питання до дослідження не знижують загального позитивного враження від представленої дисертаційної роботи, яка написана на високому науковому рівні.

Відповідність дисертації спеціальності, за якою вона подається до захисту.

Дисертаційна робота Тарабана Д. А. на тему: “Сигнальні протекторні ефекти меланіну у рослин за дії абіотичних стресорів” відповідає вимогам та паспорту спеціальності 091 Біологія в галузі знань 09 Біологія.

Загальні висновки.

Дисертаційна робота Тарабана Д. А. є завершеною науковою роботою, в якій вирішується актуальна наукова задача з встановлення ролі сигнальних посередників (АФК та іонів кальцію) у прояві стрес-протекторної дії меланіну на зернові злаки та визначення внеску антиоксидантної системи і окремих стресових метаболітів у реалізацію його фізіологічних ефектів на рослини зернових злаків у ювенільній стадії розвитку.

Таким чином, зважаючи на обґрунтованість наукових положень, наукову новизну та практичну значущість отриманих автором результатів, представлена дисертаційна робота відповідає вимогам Постанові КМ України від 12 січня 2022 р. № 44 “Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії” з останніми змінами внесеними постановою КМ № 341 від 03.05.2024 р. та наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. “Про затвердження вимог до оформлення дисертації”, а її автор, Тарабан Дмитро Анатолійович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія.

Рецензент:

Кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри генетики, селекції та насінництва
Державного біотехнологічного університету



Р.В. Рожков
Р.В. Рожков

Підпис *Рожков Р.В.*
ЗАСВІДЧУЮ
Керівник відділу діловодства ДБТУ
Рожков Р.В.