

Відгук офіційного опонента

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 91 – Біологія

в галузі знань 09 – Біологія

Актуальність теми досліджень та їх зв'язок з науковими темами.

В умовах глобальних кліматичних змін, що супроводжуються температурними коливаннями, посухами та деградацією ґрунтів, актуалізувалася проблема забезпечення стабільного врожаю сільськогосподарських культур із високими якісними показниками. Це пов'язано з обмеженою адаптивною здатністю багатьох сучасних сортів, що створює загрозу як економічній стабільності агросектору, так і продовольчій безпеці загалом. За оцінками, до 50 % втрат урожаю зумовлені негативним впливом абіотичних стрес-факторів. Зокрема, по всій території України і, особливо, у південно-східній її частині абіотичні стресори щорічно завдають значного негативного впливу на рослини, часто стаючи головною причиною пошкоджень і загибелі рослин та, як наслідок, зниження врожайності сільськогосподарських культур. Розуміння впливу абіотичних стресорів та механізмів адаптації рослин є важливим для розробки стратегій підвищення стійкості сільськогосподарських культур та забезпечення сталого виробництва в умовах України.

Одним з перспективних підходів до пом'якшення негативного впливу стресів є застосування фізіологічних методів, заснованих на використанні фітогормонів, їх аналогів, сигнальних молекул і захисних метаболітів. Серед цих речовин за останнє десятиліття привертає увагу мелатонін, який бере участь у регуляції важливих сигнальних шляхів, зокрема кальцієвих і

пов'язаних з активними формами кисню, а також взаємодіє з іншими сигнальними агентами, такими як оксид азоту і сірководень. Мелатонін сприяє підвищенню стійкості рослин до різних абіотичних стресорів, що, зокрема, пов'язано з його здатністю індукувати експресію генів антиоксидантних ферментів і посилювати синтез низькомолекулярних.

Але, незважаючи на наявні дані про участь мелатоніну в регуляції стресових реакцій, його потенціал як ендogenousного сигнального модулятора в рослин залишається розкритим не повною мірою. Саме тому дослідження сигнальних і захисних функцій мелатоніну, яке провів Тарабан Д. А., є актуальним та важливим для подальшої розробки ефективних екологічно безпечних агротехнологій, спрямованих на підвищення стійкості культур до несприятливих чинників середовища в умовах нестабільного клімату.

Дисертаційні дослідження виконувалося в рамках теми НДР 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 імені В. Я. Юр'єва НААН України.

Особистий внесок автора.

Автором опрацьовано значну кількість літературних джерел, освоєно відповідні методи досліджень та проведено необхідні експерименти для вивчення теми дисертаційного дослідження. Отримані результати були проаналізовані, узагальнені та оформлені для публікації за безпосередньої участі наукового керівника. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками Інституту рослинництва імені В. Я. Юр'єва НААН д.б.н. Ю. Є. Колупаєвим, к.б.н. Т. О. Ястреб. Частка особистої участі здобувача

становить понад 70%. Усі наукові положення та висновки, представлені в дисертації, обґрунтовані й пояснені автором самостійно, що свідчить про його високий рівень підготовки та глибоке розуміння досліджуваної тематики.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій.

Теоретичні положення та узагальнення, викладені у дисертаційній роботі здобувача, сформульовані відповідно до встановлених методичних вимог, притаманних лабораторним дослідженням такого типу, та підкріплені результатами, що були статистично оброблені із застосуванням сучасного програмного забезпечення.

Отримані результати були статистично оброблені та візуалізовані з використанням широкого спектра статистичних методів з використанням сучасних програм. Публікація результатів досліджень у провідних фахових журналах України, а також у виданнях, індексованих у базі Scopus, підтверджує наукову обґрунтованість і значущість отриманих даних.

Наукове значення отриманих результатів.

Уперше автором досліджено причинно-наслідкові взаємозв'язки між змінами кальцієвого гомеостазу, утворенням активних форм кисню (АФК) та формуванням теплостійкості рослин, індукованої мелатоніном (на моделі проростків пшениці). За допомогою інгібіторного аналізу та методів прямої оцінки генерації АФК встановлено, що підвищення теплостійкості проростків і активація ферментативної ланки їх антиоксидантного захисту під дією мелатоніну можливі лише за умов посиленого утворення АФК, що зумовлене зростанням активності НАДФН-оксидази. Водночас активація АФК-залежних процесів відбувається за участю надходження іонів кальцію як із позаклітинного середовища, так і з внутрішньоклітинних депо.

Також вперше здійснено порівняльне дослідження впливу мелатоніну на стійкість рослин *Triticumaestivum* та *Secalecereale* до дії підвищеної температури в поєднанні з низькою вологістю повітря, в ході якого виявлено видові особливості реалізації стрес-протекторних ефектів мелатоніну.

Встановлено, що жито, як більш стійкий до абіотичних чинників вид зернових культур, виявляє менш виражену реакцію на мелатонінову обробку порівняно з пшеницею.

У роботі Тарабана Д. А. вперше показано, що мелатонін здатний стимулювати проростання зернівок жита та тритикале після тривалого зберігання, знижуючи при цьому інтенсивність окиснювального стресу, що супроводжує процес проростання. Встановлено зростання активності супероксиддисмутази та каталази, підвищення вмісту антоціанів у проростках обох культур, а також активацію гваяколпероксидази у проростках тритикале.

Практичне значення одержаних результатів.

У дослідженнях автором обґрунтовано ефективність використання праймінгу насіння розчином мелатоніну як способу підвищення стійкості культурних рослин до дії абіотичних чинників. Така обробка передбачає короткочасне замочування насіння в розчині мелатоніну з подальшим висушуванням до початкової вологості, що робить метод доступним для впровадження у практику. Отримані результати також свідчать про доцільність застосування праймінгу мелатоніном для стимуляції проростання зернівок зі зниженими посівними якостями, що є особливо актуальним для селекційної та наукової роботи. Представлені дані можуть бути використані для створення спеціалізованих технологій обробки насіння з метою покращення проростання та посилення адаптаційної здатності рослин на початкових етапах онтогенезу.

Результати дослідження мають вагоме практичне значення і можуть бути використані в наукових установах НАН України та НААН України, які займаються питаннями підвищення стійкості рослин і створення агробіотехнологій для покращення адаптивних властивостей рослин і якості насіння. Отримані дані також можуть бути рекомендовані для впровадження у навчальні програми закладів вищої освіти під час підготовки фахівців з біології, біотехнології, агрономії та охорони навколишнього середовища, зокрема при викладанні курсів «Фізіологія і біохімія рослин» і спеціалізованих дисциплін, які стосуються стійкості рослин до стресових факторів.

Висновок про повноту опублікування основних положень дисертації.

Результати проведених експериментальних і теоретичних досліджень повно представлені у 14 опублікованих наукових роботах, серед яких: 4 статті у виданнях, що індексуються в наукометричній базі Scopus; 2 статті у провідних фахових виданнях України; розділ у монографії, проіндексований у базі Scopus, а також 7 тез доповідей і матеріалів конференцій, опублікованих у відповідних збірниках.

Загальна оцінка структури дисертації, мови та стилю викладання.

Представлена наукова праця включає анотацію українською та англійською мовами, перелік наукових публікацій, що стосуються теми дисертаційного дослідження, вступ, п'ять розділів, висновки до кожного розділу та загальні висновки по роботі, а також список використаних джерел. Загальний обсяг праці складає 166 сторінок комп'ютерного тексту, в роботі наведено 4 таблиці та 29 рисунків, а список цитованих джерел містить 210 найменувань, абсолютна більшість з яких подано латиницею.

Дисертаційна робота викладена літературною українською мовою з використанням актуальної наукової термінології, характерної для галузей фізіології та біохімії рослин. Зміст роботи чітко структурований, відповідає вимогам, що ставляться до наукових досліджень такого рівня, та повно і послідовно розкриває отримані результати.

Аналіз основного змісту роботи.

У вступі автор обґрунтовує наукову і практичну актуальність обраної теми, визначає зв'язок дисертаційного дослідження з науковими програмами та планами, формулює мету, об'єкт, предмет і основні завдання роботи, описує використані методи дослідження. Також у вступній частині висвітлено наукову новизну та прикладне значення одержаних результатів, наведено список умовних скорочень, використаних у тексті, перелік наукових публікацій за темою дисертації та вказано конференції, на яких проводилась апробація результатів.

Розділ 1 - наведено теоретичне узагальнення сучасних уявлень про роль мелатоніну в стрес-протекторних реакціях клітин на дію несприятливих чинників навколишнього середовища. Здійснено аналіз літературних джерел щодо прямої антиоксидантної дії мелатоніну, його впливу на експресію генів, відповідальних за синтез захисних ферментів, а також участі мелатоніну в регуляції сигнальних шляхів активних форм кисню і оксиду азоту шляхом їх прямої нейтралізації та впливу на функціонування систем, що забезпечують їх генерацію.

Розділ 2 - представлено опис вихідного рослинного матеріалу та методичних підходів, використаних у дисертаційному дослідженні. Експерименти проводилися із застосуванням трьох видів зернових культур: трьох сортів пшениці, одного сорту жита та одного сорту тритикале. Детально описано підготовку дослідного матеріалу, умови проведення експериментів, варіанти обробок та методи збору даних. Наведено всебічний аналіз результатів за морфологічними, фізіологічними та біохімічними параметрами. Отримані результати обґрунтовано за допомогою загальноприйнятих статистичних методів обробки даних та проілюстровано за допомогою сучасних комп'ютерних засобів візуалізації.

Розділ 3 - наведено результати експериментів, проведених із проростками пшениці та жита, вирощеними в умовах модельної посухи. У цьому розділі наочно продемонстровано позитивний захисний ефект мелатоніну на ріст і розвиток проростків. Встановлено оптимальні концентрації мелатоніну, які забезпечують найвищу ефективність у збереженні життєздатності рослин. Показано, що протекторна дія мелатоніну є особливо виразною у сортів, які проявляють найвищу чутливість до дії посухи.

Розділ 4 - 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.

Розділ 5 - Представлені результати вказують на вплив праймінгу зернівок пшениці мелатоніном за умов модельної посухи (вплив ПЕГ 6000) і сольового стресу, що сприяв підвищенню схожості насіння, стимулював ріст проростків та збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів. Обробка мелатоніном пом'якшувала інгібуючий вплив стресів на амілазу та сприяла накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Крім того, мелатонін збільшував активність одного з основних антиоксидантних ферментів – каталази. Було також продемонстровано, що короткочасна обробка зернівок пшениці розчинами мелатоніну з подальшим висушуванням до початкової вологості може стати ефективним методом підвищення схожості насіння та стійкості рослин до стресів, пов'язаних із зневодненням. За результатами досліджень, підвищення схожості старого насіння тритикале та жита під впливом мелатоніну можна пояснити пом'якшенням окислювального стресу, що супроводжує проростання насіння.

Висновки - Представлені результати дослідження свідчать, що обробка зернівок пшениці мелатоніном підвищує схожість насіння та сприяє кращому росту проростків за умов модельної посухи і сольового стресу. Мелатонін покращує співвідношення біомаси пагонів і коренів, пом'якшує інгібування амілази та сприяє накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Крім того, показано, що він збільшує активність каталази, одного з основних антиоксидантних ферментів. Наголошено, що короткочасна обробка насіння мелатоніном може бути ефективним методом для підвищення стійкості рослин до стресорів.

Дискусійні питання та зауваження до змісту дисертації.

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

1. У вступі, огляді літератури та висновках було б доцільно згадати про екологічну безпечність мелатоніну для використання в органічному та екологічному землеробстві та можливих наслідках для екосистем і окремих їх компонентів.

2. У дисертаційній роботі використано модель теплового стресу (44–45 °С протягом кількох годин), що дозволяє оцінити швидкі реакції рослин на екстремальні температури. Однак, для повнішого розуміння адаптивних механізмів та стрес-протекторної дії мелатоніну, доцільно було б включити експерименти з помірним тривалим тепловим стресом (38–40 °С протягом 24–48 годин). Такий підхід дозволив би дослідити довготривалі фізіологічні та біохімічні зміни в рослинах, зокрема активацію антиоксидантних систем та стабілізацію фотосинтетичного апарату, що є важливими для розробки ефективних агротехнологій у змінних кліматичних умовах.

3. У п'ятому розділі, де розглядаються реакції проростків пшениці на сольовий та осмотичний стрес (модельований за допомогою ПЕГ 6000), заслуговує уточнення той факт, що не проводилось визначення активності супероксиддисмутази (СОД), одного з ключових ферментів ферментативної ланки антиоксидантного захисту, а також інших компонентів антиоксидантного захисту, які були досліджені в попередніх серіях дисертаційного дослідження.

4. У роботі використано широкий діапазон концентрацій мелатоніну – до 500 мкМ. Проте не зазначено, чи спостерігались ознаки фітотоксичності за використання високих доз, як-от пригнічення росту чи зміна забарвлення проростків. Крім того, враховуючи перспективу практичної спрямованості дослідження, доцільним було б охарактеризувати реакцію рослин на надвисокі концентрації з метою визначення безпечних дозових меж застосування мелатоніну.

Загальний висновок щодо дисертаційної роботи.

Дисертаційна робота Тарабана Д. А. на тему: «Сигнальні протекторні ефекти меланіну у рослин за дії абіотичних стресорів» за змістом та отриманими результатами відповідає спеціальності 091 «Біологія» галузі знань 09 «Біологія».

Зважаючи на обґрунтованість наукових положень, наукову новизну та практичну значущість отриманих автором результатів, представлена дисертаційна робота відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та КМ України від 12 січня 2022 р. № 44 «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» з останніми змінами внесеними постановою КМ № 341 від 21.03.2022 р., а її автор, Тарабан Дмитро Анатолійович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин,
Дніпровський національний університет
імені Олеся Гончара



Юрій ЛИХОЛАТ

Засвідчую:

Вчений секретар

Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара



Тетяна ХОДАНЕН