

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу ТАРАБАНА ДМИТРА АНАТОЛІЙОВИЧА

«Сигнальні і протекторні ефекти мелатоніну у рослин

за дії абіотичних стресорів»,

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи. Втрати врожаю від екстремальних абіотичних чинників середовища є гострою проблемою в багатьох країнах світу, в тому числі на Україні. Одними із основних чинників, які лімітують реалізацію продуктивності сільськогосподарських культур, є такі екстремальні абіотичні стресові фактори середовища, як гіпертермія, посуха тощо. Враховуючи глобальні кліматичні зміни на Землі, одним із основних завдань, що стоять сьогодні перед сучасною селекцією, – це створення сортів сільськогосподарських рослин з підвищеними адаптивними властивостями, які здатні давати відносно стабільні урожаї зерна належної якості за екстремальних умов вирощування. У зв'язку з цим використання різних (агротехнічних, селекційних, біотехнологічних) способів підвищення стійкості рослин до стресів різної природи є найважливішим народногосподарським завданням. Вивчення механізмів формування та підвищення стійкості рослин до несприятливих чинників довкілля та ролі в цих процесах сигнальних систем і різних сигнальних посередників, стресових метаболітів є однією з найактуальніших проблем сучасної біології. Серед сполук, причетних до регуляції адаптивних реакцій рослин, відносяться деякі нейротрансмітери, зокрема мелатонін. Відомо, що нейротрансмітери відіграють важливу роль у житті рослин, впливають на іонну проникність, фотосинтез, органогенез, цвітіння, циркадний ритм, розмноження, процеси росту і морфогенезу, адаптацію до змін навколишнього середовища. Показано, що мелатонін бере участь у регуляції ключових сигнальних шляхів. Однак,

незважаючи на значний прогрес у вивченні властивостей мелатоніну, молекулярні механізми його дії, функціональні зв'язки з іншими компонентами сигнальної мережі з'ясовані далеко не повністю, що обмежує можливості його широкого застосування в рослинництві. Зважаючи на це, дисертаційна робота Тарабана Дмитра Анатолійовича, основною метою якої було з'ясування ролі сигнальних посередників (АФК та іонів кальцію) у прояві стрес-протекторної дії мелатоніну на зернові злаки та визначення внеску антиоксидантної системи і окремих стресових метаболітів у реалізацію його фізіологічних ефектів на рослини у ювенільній стадії розвитку, є дуже актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами темами.

Дисертаційна робота виконувалася в рамках теми НДР кафедри землеробства та гербології Державного біотехнологічного університету «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.

Структура дисертації. Дисертація Тарабана Дмитра Анатолійовича має класичну структуру і складається з анотації, вступу, п'яти розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень, три експериментальні розділи), висновків. Робота викладена на 166 сторінках, містить 29 рисунків і 4 таблиці. Список цитованої літератури нараховує 208 джерел, з яких значна частина за останні 5-10 років та англомовні посилення.

Анотація дисертації відповідає вимогам до оформлення дисертацій згідно з Наказом МОН №40 від 12.01.2017.

Вступ не викликає принципових зауважень. Автор лаконічно і чітко формулює актуальність, наукову новизну та практичне значення роботи.

Перший розділ дисертації «Огляд літератури» складається з 4 підрозділів, в яких наведені існуючі в літературі відомості стосовно мелатоніну та його участі в адаптивних реакціях рослин, зокрема біосинтез мелатоніну, зміну вмісту мелатоніну у рослин у відповідь на дію стрес-факторів, роль мелатоніну як учасника сигнальної мережі рослинних клітин, регуляцію адаптивних реакцій рослин екзогенним мелатоніном за дії різних стресових факторів: екстремальних температур, посухи, засолення, вплив мелатоніну на проростання насіння. Дисертант виділив існуючі проблемні та малодосліджені питання. Зокрема, Д.А. Тарабан приділив увагу недостатньому поясненню питання як поєднується пряма антиоксидантна дія і здатність індукувати експресію генів каталітичної субодиниці НАДФН-оксидази – основного ферментативного генератора АФК, чи пов'язані між собою і яким чином ефекти мелатоніну, що спричиняють зміни кальцієвого і редокс-гомеостазу, впливу мелатоніну на ключові стрес-протекторні системи рослин (антиоксидантну, осмопротекторну, шаперонну та інші), видовим і сортовим особливостям прояву ефектів мелатоніну. Всі ці невирішені питання і були передумовою виконання даної дисертаційної роботи. Слід відзначити, що огляд літератури базується на актуальних сучасних даних, серед яких значна частина англomовних публікацій.

У розділі „Матеріал, умови і методи досліджень” детально описано об'єкти і методи досліджень, умови проведення експериментів. Автором охарактеризовані об'єкти дослідження: проростки пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.), зернівки жита посівного (*Secale cereale* L.), тритикале (*Triticosecale* Wittmack).

Відповідно до поставлених мети і завдань дисертант використовував сучасні фізіологічні (дослідження впливу праймінгу насіння зернових злаків мелатоніном на його проростання і ріст проростків за стресових і нормальних умов); біохімічні (визначення показників генерації АФК та окиснювального стресу, аналіз активності антиоксидантних ферментів, амілази, сумарного вмісту розчинних вуглеводів, проліну, загального вмісту фенольних сполук, флавоноїдів, антоціанів); статистичні (використання пакету статистичного аналізу Statistica, версія 10.0, дисперсійний і кореляційний аналізи) методи досліджень. Структура розділу загальноприйнята, логічна. Статистичні методи не викликають сумнівів у підрахунку числових показників.

Розділ 3 (перший експериментальний) присвячено вивченню впливу мелатоніну на стійкість рослинних об'єктів до високих температур і модельної посухи. Д. А. Тарабан проведеними дослідження засвідчив, що обробка проростків пшениці розчинами мелатоніну в концентраціях діапазону від 10^{-8} до 10^{-5} М підвищувала їх виживаність після ушкоджувального прогріву. Максимальний позитивний ефект спричиняла концентрація порядку 10^{-6} М. Дисертатнтом встановлено, що за передпосівної обробки насіння пшениці і жита мелатоніном в концентраціях 20-100 мкМ зменшувалось інгібування росту проростків після впливу на них помірного теплового стресу, поєднаного з помірною повітряною посухою. Більш помітний протекторний ефект мелатоніну виявлено на проростках пшениці. Автором встановлено, що крім позитивного впливу на ріст проростків, що зазнали дії стресорів, обробка зернівок пшениці мелатоніном сприяла збереженню у проростках вмісту води, близького до контрольного варіанта. Отримані результати дозволили дисертанту зробити висновок, що обробка мелатоніном (концентрація 0,2-5,0 мкМ, надходження через корені) зменшувала інгібування росту коренів і пагонів проростків за умов посухи, спричинюваної дією ПЕГ 6000 у двох сортів пшениці. При цьому більш виразно захисні ефекти мелатоніну проявлялися за його впливу на проростки чутливого до посухи сорту.

У розділі 4 проведено дослідження механізмів індукування мелатоніном тепло- і осмостійкості проростків злаків. Отримані дисертантом результати свідчать про індукування теплостійкості етіольованих проростків пшениці екзогенним мелатоніном та залучення АФК та іонів кальцію в реалізацію стрес-протекторної дії мелатоніну або продуктів його перетворення, його вплив на активність антиоксидантних ферментів. Порівняння впливу праймінгу насіння мелатоніном на теплостійкість проростків пшениці і жита виявило наявність видових відмінностей його ефектів. Дисертантом було показано, що стрес-протекторна дія мелатоніну пов'язана з нормалізацією функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем рослин за умов посухи і вона певною мірою залежить від сортових особливостей адаптивних стратегій злакових рослин.

У розділі 5 наведено експериментальні дані по дослідженню впливу мелатоніну на проростання зернівок злаків за нормальних і стресових умов. Дисертантом було встановлено, що праймінг зернівок пшениці мелатоніном за умов модельної посухи і сольового стресу підвищував їх схожість, посилював ріст проростків, збільшував співвідношення між біомасою пагонів і коренів, пом'якшував спричинюване стресами інгібування амілази і сприяв накопиченню розчинних вуглеводів у пагонах проростків. Під впливом мелатоніну зменшувалися показники генерації АФК і прояву окиснювальних пошкоджень у клітинах пагонів проростків пшениці та зростала активність одного з ключових антиоксидантних ферментів – каталази. Автором показано, що праймінг старого насіння тритикале і жита мелатоніном істотно підвищував їх схожість, посилював ріст проростків, знижував генерацію супероксидного аніон-радикала та вмісту пероксиду водню і МДА у проростках, а також підвищував активність антиоксидантних ферментів та вмісту антоціанів.

Після експериментальних розділів наводяться висновки із результатів досліджень, список використаної літератури. В рамках єдиного комплексного дослідження показано, що праймінг насіння зернових злаків мелатоніном або обробка ним проростків спричиняє помітне підвищення стійкості до дії абіотичних стресорів. Також обробка насіння мелатоніном підвищує схожість злаків з низькими посівними якостями та позитивно впливає на проростання насіння за несприятливих умов. Дисертантом встановлено, що стрес-протекторні ефекти мелатоніну проявляються за дії чинників різної природи (високих температур, модельної посухи або засолення), за різної сили стресових впливів і характерні для різних видів і сортів зернових злаків, прояв таких ефектів залежить від генотипу рослин. Автором зроблено висновок, що використання екзогенного мелатоніну може бути ефективним інструментом для регулювання росту і стійкості злаків у практиці рослинництва.

Наукова новизна роботи. Д. А. Тарабан вперше провів дослідження причинно-наслідкових зв'язків між змінами кальцієвого гомеостазу, генерацією АФК та формуванням індукованої мелатоніном теплостійкості рослин (на прикладі проростків пшениці). З використанням інгібиторного аналізу та прямих методів оцінки генерації АФК 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. Дисертантом вперше проведено порівняльне дослідження дії мелатоніну на стійкість пшениці і жита до впливу гіпертермії у поєднанні з низькою вологістю повітря і встановлено видові особливості прояву стрес-протекторних ефектів мелатоніну. Автором було відзначено менш помітний вплив передобробки мелатоніном на функціонування протекторних систем жита, як більш стійкого виду. Дисертантом виявлено сортові особливості

стрес-протекторної дії мелатоніну на проростки пшениці за умов модельної посухи та показано більш помітний прояв захисних ефектів мелатоніну у непосухостійкого сорту. Автором вперше встановлено здатність мелатоніну посилювати проростання старих зернівок жита і тритикале та зменшувати прояв окиснювального стресу, яким супроводжується процес проростання зернівок. Виявлені ефекти підвищення активності ключових антиоксидантних ферментів (СОД і каталази), вмісту антоціанів у проростках обох видів і зростання активності активності гваяколпероксидази у тритикале.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертації Д. А. Тарабана мають значну перспективу щодо практичного використання.

Так, виявлені дисертантом можливість підвищення стійкості зернових злаків до абіотичних стресів шляхом праймінгу насіння розчинами мелатоніну та позитивний вплив праймінгу мелатоніном на проростання зернівок злаків з низькими посівними якостями 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. Така обробка зернівок може використовуватися як спосіб відновлення схожості насіння з низькими посівними якостями.

Результати роботи можуть бути використані у навчальному процесі та при проведенні фундаментальних і прикладних досліджень в інших закладах вищої освіти і 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.

Дисертаційна робота викладена дуже логічно, добре оформлена, вдало проілюстрована таблицями і рисунками, написана хорошою науковою українською мовою, ретельно вичитана і майже не містить технічних помилок. У більшості експериментальних розділів і підрозділів міститься не лише обґрунтування конкретних цілей, а й наведені робочі гіпотези, що дозволяє

відстежувати логіку роботи. Обґрунтування і достовірність наукових положень і висновків дисертантки не викликають заперечень.

Апробація результатів досліджень. Всього за матеріалами дисертації Тарабан Д. А. опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 7 статей у провідних фахових виданнях України та інших країн, з них 4 у журналах та 1 у монографії, що індексовані у міжнародній наукометричній базі “Scopus”.

Робота апробована шляхом представлення та обговорення результатів дослідження на Міжнародній науковій конференції, присвяченій 140 річчю з дня народження академіка Андрія Сапегіна (1883–1946), (19 жовтня 2023 р. / СГП–НЦНС. – м. Одеса, Україна), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Лісівництво, переробляння деревини та землевпорядкування: здобутки, стан і перспективи» (29–30 жовтня 2024 р./ ДБТУ - Харків, Україна); Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Сучасні технології в рослинництві» (НААН України Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, 27-28 листопада 2024 р. Харків, Україна); XV З'їзді Українського ботанічного товариства (30 вересня — 4 жовтня 2024 р. Івано-Франківськ, Україна); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 125-річчю від дня народження професора Ф.П. Мацкова «Стрес та адаптація рослин» (7-8 червня 2023 р. Харків, Україна); Всеукраїнській конференції з молекулярної та клітинної біології з міжнародною участю (15-17 червня 2022 р. Київ, Україна); Міжнародній науковій інтернет-конференції «Селекція, генетика та біотехнологія сільськогосподарських рослин: досягнення, інновації та перспективи» (26 жовтня 2022 р., Одеса, Україна).

Публікації, основний зміст роботи, наведений в анотації дисертації та висновки повністю відображають результати роботи.

Зауваження по дисертації:

1. У розділі 2.3 відсутні посилання на методи визначення антиоксидантних ензимів.

2. При опису результатів досліджень в експериментальних розділах 4 та 5 вміст флавоноїдів та антоціанів у таблиці 4.2 та рис. 5.12 представлено у величинах оптичної густини розчинів на г сирої маси. Бажано було б представити ці дані в перерахунку на мг/г або в % з використанням стандартних речовин флавоноїдів та антоціанів.

3. В дисертації при визначенні впливу мелатоніну на стійкість рослин до абіотичних стресових факторів, досліди проводили тільки в лабораторних умовах. Бажано б було підтвердити ці дані в польових умовах.

4. В розділі 5 при вивченні впливу мелатоніну на проростання зернівок злаків за нормальних і стресових умов автором приділено увагу активності амілази, антиоксидантних ензимів, вмісту вуглеводів та ін. Проте не досліджені інші ензими, що активуються та приймають участь в процесах проростання, такі як протеолітичні ензими, ліпази.

5. Практична цінність роботи не була підтверджена конкретними запатентованими розробками або методичними рекомендаціями. Бажано б було це зробити в подальшій роботі.

6. У роботі трапляються технічні помилки. Наприклад, у розділі 1, стор. 29 “У даний час активно досліджуються і вже знаходять практичне застосування як стрес-проектори такі групи рослинних гормонів і стресових метаболітів, як **брасиностроїди...**”, у 1 висновку, стор. 137 “**10-хвилинний** прогрів проростків...”.

Вказані недоліки жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Дисертаційна робота Д. А. Тарабана є самостійною завершеною цілісною науковою роботою з наявністю новизни і практичного значення. В дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Вважаю, що за актуальністю, обсягом, змістом проведених досліджень, науковим рівнем та новизною, практичним значенням отриманих результатів, повнотою їх опублікування та відсутністю порушення академічної доброчесності дисертаційна робота ТАРАБАНА Дмитра Анатолійовича повністю відповідає вимогам «Порядку проведення експерименту з присудження ступеня доктора філософії» від 6 березня 2019 року №167, наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» та постанови КМ України № 44 від 12 січня 2022 р. «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», а її автор, безумовно, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

доктор біол. наук, старший науковий співробітник,
зав. лабораторії біохімії рослин

Селекційно-генетичного інституту –

Національного центру насіннєзнавства

та сортовивчення

О.О. Молодченкова

