РЕЦЕНЗІЯ
кандидата біологічних наук, доцента
Рожкова Романа Вікторовича
на дисертаційну роботу
Шахова Івана Валерійовича
на тему: " **Механізми стрес-протекторної дії γ-аміномасляної кислоти на зернові злаки** ",
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
за спеціальністю 91 – Біологія
в галузі знань 09 – Біологія

Актуальність теми досліджень та її зв'язок з планами роботи кафедри.

На сучасному етапі значно загострилась проблема забезпечення населення продовольством, що з одного боку обумовлено постійним зростанням народонаселення, а з іншого нестабільністю отримання надійних врожаїв через глобальні кліматичні зміни по всій планеті. Одним з ефективних шляхів вирішення цієї проблеми в короткостроковій перспективі може стати широке використання фізіологічно активних речовин як протекторних сполук і сигнальних посередників, що сприятиме реалізації генетичного потенціалу продуктивності рослин в умовах стресу.

До таких сполук, зокрема, належить і γ-аміномасляна кислота (ГАМК), яка бере участь у центральному карбоновому метаболізмі, засвоєнні нітрогену та функціонує як регуляторна молекула під час стресу та адаптації. В умовах стресу концентрація цієї кислоти в рослинах зазвичай підвищується, що вказує на її роль в стимулюванні адаптивних реакцій у рослин. Поряд з тим, самі механізми стрес протекторної реакції залишаються малодослідженими. Не розкритими, зокрема, залишаються питання, пов'язані із залученням активних форм оксигену (АФО), іонів кальцію, нітроген оксиду (NO) в реалізацію стрес-протекторного впливу ГАМК на рослини за умов високотемпературного та осмотичного стресів. Видові особливості стрес-протекторної дії ГАМК на зернові злаки також поки що досліджені недосттньо.

Зважаючи на це, дисертаційне дослідження Шахова І.В. становить актуальність як для теоретичного розуміння формування захисних адаптивних реакцій у рослин, так і характеризуються прикладною значущістю з огляду на перспективи практичного застосування ГАМК при розробці сучасних агротехнологій підвищення адаптивності рослин.

Дисертаційне дослідження виконувалося в рамках проєктів 14.00.02.05 Пк «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, а також теми НДР кафедри землеробства та гербології Державного біотехнологічного університету «Регуляція адаптивних реакцій рослин з участю активних форм кисню і азоту та нейромедіаторів» (№ держреєстрації 0123U100582).

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

Шахов І. В. самостійно здійснив пошук та опрацювання наукових джерел інформації, оволодів відповідними методами досліджень та провів всі необхідні експерименти. Отримані результати інтерпретовані, узагальнені і підготовлені до публікації за участі наукового керівника Колупаєва Ю. Є. Частина експериментів проведена спільно зі співробітниками Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України к. б. н. Т. О. Ястреб та д-ром філософії О. І. Кокоревим. Частка особистої участі здобувача становить понад 70 %. Всі сформульовані в дисертації твердження і висновки мають оригінальне обґрунтування та пояснення сформульовані Шаховим І. В. особисто.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій.

Теоретичні положення та узагальнення наведені в дисертаційній роботі здобувача здійснені з дотриманням всіх методичних вимог, що висуваються до лабораторних досліджень та обґрунтовані і підтверджені з використанням сучасних методів статистичної обробки результатів за допомогою відповідного програмного забезпечення.

Вибірка у кожному з повторень при визначенні впливу ГАМК та інших сполук на проростання насіння та біомасу проростків складала 80 зернівок або проростків, в експериментах з дослідження впливу ГАМК на стійкість до стресорів у кожному повторенні використовували не менше 30 проростків. Досліди проведені в 3 кратній повторності.

Результати досліджень оброблені і візуалізовані з використанням широкого набору статистичних методів. Статистичні розрахунки, аналіз головних компонент (PCA) та загальний аналіз даних виконували в середовищі R (версія 4.5.1) із використанням інтегрованого середовища розробки RStudio (версія 2025.01.1+403). Вірогідність відмінностей між експериментальними варіантами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Кореляційний аналіз Пірсона та побудову теплових карт проводили в Microsoft Excel 2016. Для комплексної оцінки впливу досліджуваних факторів та їх взаємодії на аналізовані показники застосовували однофакторний або двофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA). У разі виявлення статистично значущого ефекту проводили пост-хок аналіз із використанням критерію найменшої суттєвої різниці Фішера (LSD-test) та тесту Тьюкі (HSD-test). Для контролю ймовірності помилки першого роду при множинних порівняннях в окремих випадках застосовували поправку Бонферроні.

Таким чином, використаний статистичний інструментарій, а також публікації результатів досліджень у провідних фахових виданнях України та виданнях, що входять до переліку Scopus та Web of Science підтверджують обґрунтованість та достовірність одержаних здобувачем результатів.

Наукове значення отриманих результатів.

Здобувач вперше показав роль АФО, що генеруються за участю НАДФН-оксидази, в індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією ГАМК та із застосуванням інгібіторного аналізу отримав дані про залучення іонів кальцію, що надходять в цитозоль з внутрішньоклітинних компартментів, в регуляцію утворення АФО і активності антиоксидантних ферментів.

Шахов І. В. переконливо довів, що індукування праймінгом ГАМК проростання насіння і росту проростків пшениці за умов осмотичного стресу опосередковане нітроген оксидом. Основними складовими такого ефекту ГАМК є зміни в метаболізмі вуглеводів і синтезі вторинних метаболітів, а саме – зростання під її впливом активності амілази у зернівках і накопичення цукрів у пагонах проростків, підвищення загального вмісту фенольних сполук і стабілізація в стресових умовах вмісту антоціанів. Вказані ефекти ГАМК не проявлялися в присутності скавенджера NO метиленового синього. Водночас за дії ГАМК відбувалося зростання ендогенного вмісту NO у пагонах, а екзогенна обробка насіння донором нітроген оксиду нітропрусидом натрію (НПН) призводила до фізіологічних ефектів, схожих на спричинювані дією ГАМК.

Уперше досліджені видові особливості реакції на дію екзогенної ГАМК проростків тритикале, який відрізняється від пшениці більш активним накопиченням вторинних метаболітів. Показана можливість підвищення посухо- та солестійкості проростків тритикале їх обробкою ГАМК, що виявлялася у значному пом'якшенні рістінгібувальної дії цих двох стресорів та особливо їх комбінації. При цьому ГАМК помітно підвищувала обводненість тканин і зменшувала прояви окиснювального стресу. Протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів у фізіологічно нормальних та стресових умовах, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу розчинних вуглеводів та істотному зростанні вмісту фенольних сполук і антоціанів.

Також, уперше було показано позитивний вплив праймінгу ГАМК на проростання насіння пшениці і тритикале зі зниженими посівними якостями, який зумовлений пом'якшенням окиснювального стресу, особливо інтенсивного при проростанні старого насіння.

Практичне значення одержаних результатів.

Здобувач своїми дослідженнями показав можливість підвищення шляхом праймінгу розчинами ГАМК стійкості зернових злаків (пшениці, тритикале) до осмотичних стресів при проростанні насіння. Вперше проведено порівняння впливу фоліарної обробки та праймінгу насіння ГАМК

на посухостійкість рослин у фазі двох листків і встановлено більш помітні позитивні ефекти праймінгу на ростові характеристики, водний режим рослин, вміст фотосинтетичних пігментів та функціонування стрес-протекторних систем. Ці результати роботи можуть мати безпосереднє застосування в агробіотехнологічній практиці.

Також дисертантом доведено можливість використання праймінгу ГАМК як способу підвищення схожості насіння зернових злаків з низькими посівними якостями, зумовленими старінням, що може бути застосовано у роботі з генетичними ресурсами рослин. Отримані результати включені у науково-методичні рекомендації «Оцінка стрес-протекторного впливу фізіологічно активних речовин на зернові злаки» (2023 р.), «Підвищення схожості насіння зернових злаків праймінгом фізіологічно активними речовинами» (2024 р.) та «Індукування стійкості зернових злаків до абіотичних стресорів праймінгом насіння фізіологічно активними речовинами (2025 р.), виданими Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України за співавторства здобувача.

Результати роботи можуть використовуватися у наукових установах НАН України і НААН України та закладах вищої освіти, які проводять фундаментальні і прикладні дослідження у галузі стресу і адаптації рослин. Крім того, отримані результати можуть бути включені у навчальні програми закладів вищої освіти для підготовки фахівців у галузі біології, біотехнології, агрономії, екології та інших суміжних дисциплін.

Висновок про повноту опублікування основних положень дисертації.

Результати проведених експериментальних досліджень достатньо повно викладені і розкриті в 13 опублікованих наукових працях, з яких 6 статей у виданнях, що індексується в наукометричній базі Scopus; одна стаття в провідному фаховому журналі України "Фізіологія рослин та генетика", а також опубліковано 6 тез доповідей та матеріалів у збірниках конференцій. Окрім того, результати досліджень включені до трьох опублікованих науково-методичних рекомендацій, призначених для використання в наукових установах та для впровадження у виробництві.

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 проведено ретельний аналіз сучасних джерел, щодо ролі ГАМК в стрес-протекторних реакціях клітини на дію несприятливих чинників довкілля. Зокрема, висвітлюється зв'язок ГАМК з такими

важливими стресовими метаболітами, як поліаміни і пролін, котрі також залучені в стресову сигнально-регуляторну мережу. Також показано, що ГАМК належить до молекул, які чинять комплексний вплив на редокс-гомеостаз, пов'язаний з її залученням у процеси формування пулу відновника НАДН та синтез сукцинату, прямою антиоксидантною дією і впливом на експресію генів антиоксидантних ферментів. В розділі описуються і тісні функціональні зв'язки ГАМК з нітроген оксидом, що вказують як на вплив NO на синтез ГАМК, так і на участь нітроген оксиду в трансдукції сигналів ГАМК.

Другий розділ присвячений опису вихідного матеріалу та методики досліджень, якими послуговувався здобувач при постановці експерименту. Робота виконана з використанням чотирьох сортів пшениці м'якої озимої: 'Досконала', 'Тобак', 'Етана' і 'Скорпіон' та сорту тритикале озимого 'Раритет'. Наведено детальний опис дизайну експерименту із зазначенням фізіологічних показників, які оцінювались в досліді із зерновими культурами. Ретельно описана методика різних етапів досліджень за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками та властивостями. Результати отриманих досліджень обґрунтовані з використанням сучасних методів статистичного аналізу та візуалізовані з використанням відповідних комп'ютерних програм.

В ***третьому*** розділі показано позитивний вплив екзогенної ГАМК на інтегральні показники, що характеризують стійкість пшениці і тритикале до основних абіотичних стресорів. За результатами досліджень підтверджено, що обробка ГАМК істотно підвищувала виживаність проростків пшениці і тритикале після потенційно летального теплового стресу, зменшувала інгібування накопичення біомаси органів за умов осмотичного стресу та сприяла підвищенню відносного вмісту води у тканинах за умов осмотичного стресу.

В ***четвертому*** розділі представлені результати вказують на те, що індуковане ГАМК підвищення теплостійкості проростків пшениці відбувається із залученням АФО та іонів кальцію як ключових сигнальних посередників. Під впливом ГАМК значно зменшувалися спричинювані тепловим стресом ушкодження мембран клітин коренів та знижувався вміст в них продуктів ПОЛ. Показано також, що ефекти ГАМК повністю усувалися попереднім внесенням у середовище інкубації коренів скавенджера гідроген пероксиду диметилтіосечовини та значною мірою пригнічувалися в присутності інгібітору НАДФН-оксидази імідазолу. Відзначено диференційований прояв стрес-протекторної дії ГАМК, залежний від адаптивних стратегій конкретних сортів. Встановлено, що протекторна дія ГАМК виявлялася у підвищенні активності антиоксидантних ферментів, посиленні накопичення проліну, стабілізації пулу цукрів та помітному збільшенні вмісту фенольних сполук та антоціанів.

П'ятий розділ присвячений праймінгу зернівок пшениці ГАМК 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. Дисертантом вперше встановлено, що індукування праймінгом ГАМК проростання насіння і росту проростків пшениці за умов осмотичного стресу опосередковане нітроген оксидом, складовими цього ефекту є зміни в метаболізмі вуглеводів і синтезі вторинних метаболітів, підвищення загального вмісту фенольних сполук і стабілізація в стресових умовах вмісту антоціанів. Підвищення схожості насіння у зразків пшениці і тритикале під впливом ГАМК може пояснюватися пом'якшенням окиснювального стресу, який розвивається при проростанні старіючого насіння.

Висновки включають підсумки та узагальнення результатів поведених досліджень.

Оцінка структури дисертації, мови та стилю викладання.

Представлена на рецензування кваліфікаційна наукова праця включає анотацію українською та англійською мовами, перелік наукових праць опублікованих за темою дисертаційних досліджень, вступ, розділ з детальним оглядом літературних джерел, розділ з описом дизайну експериментів, три розділи з результатами експериментальних досліджень, висновки до кожного розділу та загальні висновки по роботі, список літератури. Загальний обсяг 198 сторінок комп'ютерного тексту, містить 53 рисунки, список цитованих джерел включає 237 найменувань, переважна більшість з яких надруковані латиницею.

Дисертація написана на високому науковому рівні з використанням сучасної термінології, поширеної в фізіології та біохімії рослин. Викладення матеріалу цілком відповідає змісту та вимогам, що висуваються до дисертаційних робіт, висновки конкретні і логічні, відповідають поставленим завданням і повною мірою висвітлюють результати проведених досліджень.

Зауваження щодо змісту дисертації.

Незважаючи на загальне позитивне враження від прорецензованої роботи та високий рівень представлення проведених досліджень, до поданої на розгляд дисертації виникли наступні зауваження і побажання:

1. На наш погляд, не до кінця зрозумілим і недостатньо обґрунтованим є вибір науковцями вихідних для досліджень сортів пшениці. Не зазначено, чи проводився попередній скринінг поширених у виробництві сортів пшениці з метою їх диференціації за рівнем посухостійкості, зокрема на ювенільному етапі розвитку. В дисертації зазначається, що вітчизняний сорт "Досконала" за рівнем ювенільної посухостійкості поступається сорту німецької селекції 'Tobak", але з огляду на походження останнього виникають сумніви, чи дійсно це контрастні за показником посухостійкості сорти. В зв'язку з цим, можна порадити авторам при плануванні подальшої наукової роботи, проводити попередні дослідження серед зареєстрованих в Україні сортів пшениці з метою виділення стандартів з різним рівнем посухостійкості.

2. Під час попереднього рецензування дисертаційної роботи Шахова І. В., як винятки, траплялись орфографічні описки і помилки. Також виникали зауваження і до оформлення та представлення рисунків, проте в кінцевому варіанти всі зауваження здобувачем були враховані і внесені відповідні правки.

Відповідність дисертації спеціальності, за якою вона подається до захисту.

Дисертаційна робота Шахова І. В. на тему: "Механізми стрес-протекторної дії γ-аміномасляної кислоти на зернові злаки" відповідає вимогам та паспорту спеціальності 91 "Біологія" в галузі знань 09 – Біологія.

Загальні висновки.

Дисертаційна робота Шахова І. В. є завершеною науковою роботою, в якій вирішується актуальне і важливе в умовах глобальних змін клімату наукова завдання з встановлення ролі основних клітинних сигнальних посередників – АФО, іонів Ca^{2+} та нітроген оксиду – у реалізації впливу ГАМК на стійкість пшениці м'якої і тритикале до дії абіотичних чинників середовища на ювенільних етапах онтогенезу, досліджується вплив ГАМК на метаболічні процеси, важливі для адаптації рослин до високотемпературного стресу, посухи і засолення.

Таким чином, зважаючи на обґрунтованість наукових положень, наукову новизну та практичну значущість отриманих автором результатів, представлена на рецензування дисертаційна робота відповідає вимогам наказу МОН України № 40 від 12.01.2017 р. "Про затвердження вимог до оформлення дисертації" та КМ 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, Шахов Іван Валерійович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 91 "Біологія".

Рецензент:

Кандидат біологічних наук, доцент,
доцент кафедри генетики, селекції та насінництва
Державного біотехнологічного університету Р.В. Рожков

Підпис Рожкова Р
ЗАСВІДЧУЮ
Керівник відділу діловодства ДБТУ