ВІДГУК
офіційного опонента Козеко Людмили Євгенівни
на дисертаційну роботу ШАХОВА Івана Валерійовича
«МЕХАНІЗМИ СТРЕС-ПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ γ-АМІНОМАСЛЯНОЇ КИСЛОТИ НА ЗЕРНОВІ ЗЛАКИ»,
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
зі спеціальності 091 «Біологія» (09 – Біологія)

Актуальність теми. Враховуючи зміни в температурному і водному режимі та посилення загрози збільшення періодів екстремальних температур і посухи протягом вегетаційного періоду внаслідок глобальних змін клімату (Korres et al., 2016; Ivaniuta et al., 2020), важливим є пошук нових екологічно безпечних шляхів підвищення стійкості рослин до несприятливих чинників. Одним з перспективних підходів є застосування фізіологічно-активних речовин, до яких відноситься γ-аміномасляна кислота (ГАМК). Ця непротеїногенна амінокислота, більш вивчена як головний негативний нейромедіатор центральної нервової системи тварин, протягом останніх років привертає значну увагу рослинних біологів. ГАМК накопичується у високих концентраціях у рослинних клітинах за стресових умов і, як вважається, відіграє ключову роль у первинному метаболізмі карбону і нітрогену, регуляції цитозольного pH, захисті клітин від активних форм оксигену (АФО), трансдукції сигналів, що вкрай важливо для адаптації рослин до високих температур і водного дефіциту. Є відомості про позитивний вплив обробки ГАМК на стійкість рослин до високих і низьких температур, посухи тощо. Проте фрагментарними, а іноді й суперечливими залишаються відомості про функціональні зв'язки ГАМК із важливими сигнальними шляхами рослин, зокрема за участю АФО, нітроген оксиду (NO) та іонів кальцію. Недостатньо вивчено молекулярні механізми екзогенної ГАМК у підвищенні стійкості рослин до стресових факторів.

Дане дисертаційне дослідження здійснено з використанням важливих продовольчих злакових культур – пшениці м'якої і тритикале. Пшениця – одна з головних зернових культур у світі й Україні. Актуальність підвищення її продуктивності за варіабельних факторів довкілля є безперечною. *Triticale*,

штучно створений селекціонерами рід шляхом схрещування жита з пшеницею, є важливою продовольчою і зернофуражною культурою, яка перевищує батьківські види за низкою ключових ознак (урожайність, харчова цінність). Проте вплив ГАМК на продуктивність тритикале залишається не з'ясованим. Не менш важливою є проблема підвищення схожості насіннєвого матеріалу за несприятливих умов і після тривалого або неналежного зберігання та застосування для цього фізіологічно активних речовин, зокрема ГАМК.

Дослідженню цих надважливих питань, що мають фундаментальну складову та спрямовані на розробку кліматично оптимізованих агротехнологій, присвячено дисертаційну роботу І.В. Шахова.

Мета, завдання і методи досліджень. Автор чітко сформулював мету дослідження, яка полягала у встановленні участі ключових клітинних сигнальних посередників – АФО, іонів кальцію та нітроген оксиду – у реалізації впливу ГАМК на стійкість зернових злаків до дії абіотичних стресорів і процеси проростання зернівок, а також у виявленні метаболічних процесів, чутливих до дії екзогенної ГАМК. Для досягнення поставленої мети автором визначено конкретні завдання і застосовано фізіологічні (визначення впливу обробки ГАМК на стійкість рослин до абіотичних стресорів і проростання насіння, інгібіторний аналіз ГАМК, використання модуляторів АФО, іонів кальцію та NO тощо), біохімічні (визначення інтенсивності генерації АФО та NO, активності амілази та антиоксидантних ферментів, вмісту первинних і вторинних стресових метаболітів) та статистичні (дисперсійний аналіз із подальшими множинними порівняннями за методом Тьюкі, кореляційний аналіз, аналіз головних компонент) методи, які є адекватними для вирішення завдань дослідження і доведення достовірності отриманих даних.

Наукова новизна одержаних результатів.

Дисертаційна робота І.В. Шахова істотно доповнює знання про фізіологічні та молекулярні механізми впливу екзогенної ГАМК на зернові злаки за нормальних і стресових умов, зокрема у посиленні стійкості рослин

на ранніх фазах онтогенезу до високої температури, водного дефіциту і засолення, дає нові відомості щодо використання ГАМК для фоліарної обробки і праймінгу зернового матеріалу, а також впливу ГАМК на тритикале. Дисертантом отримано пріоритетні дані щодо участі АФО, іонів кальцію і нітроген оксиду в реалізації ефектів екзогенної ГАМК. Вперше встановлено здатність ГАМК регулювати редокс-гомеостаз і накопичення осмолітів у етіольованих проростків тритикале за водного дефіциту і засолення. Вперше доведено участь нітроген оксиду в реалізації впливу праймінгу ГАМК на проростання зернівок і ріст проростків пшениці. Вперше показано позитивний вплив праймінгу ГАМК на проростання насіння пшениці і тритикале зі зниженими посівними якостями.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати створюють теоретичні засади використання ГАМК для розробки нових агротехнологічних підходів з використанням фоліарної обробки і праймінгу насіннєвого матеріалу для посилення стресостійкості зернових злаків та підвищення здатності до проростання насіннєвого матеріалу низької якості.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій. Автором опрацьовано методики проведення фізіологічних і біохімічних лабораторних досліджень, проведено необхідні експерименти. Отримані дані оброблено статистично, їхня достовірність не викликає сумнівів. На основі аналізу результатів роботи в цілому дисертантом сформульовано висновки, які повністю відповідають меті і завданням дослідження, безпосередньо випливають з експериментальних даних і є обґрунтованими.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконувалось у рамках проєктів «Розроблення тест-системи для скринінгу стрес-протекторної дії нових фізіологічно активних речовин на зернові злаки» (ДР № 0123U100486) і «Розробка методів праймінгу насіння зернових злаків дією донорів газотрансмітерів та сполук з гормональною активністю» (ДР № 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» (ДР № 0123U100582).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація І.В. Шахова складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, трьох експериментальних розділів з висновками до кожного розділу, які обґрунтовують здійснене дослідження, загальних висновків дисертаційної роботи та списку цитованої літератури (237 джерел, переважно англомовних). Дисертація викладена на 198 сторінках друкованого тексту і містить 53 рисунки.

У вступі викладено актуальність дисертаційної роботи, мету і завдання, об'єкт і предмет дослідження, окреслено використані методи, наведено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів, зв'язок роботи з науковими темами, особистий внесок здобувача й апробацію результатів дослідження.

У розділі 1 представлено огляд наукової літератури та проаналізовано сучасні дані вітчизняних і закордонних дослідників за темою дисертації. Автор окреслив теоретичні проблеми у вивченні стресу рослин щодо механізмів сприйняття зовнішніх впливів, посередників у передачі сигналів та індукції клітинної відповіді, відзначив важливу роль у цих процесах іонів кальцію, АФО і газотрансмітерів, зокрема нітроген оксиду, наголосив на актуальності вивчення ГАМК як сигнального посередника у стресовій реакції й адаптації рослин.

В окремих підрозділах огляду надано характеристику процесів функціонування АФО і нітроген оксиду. Зокрема, описано джерела та компартменти генерації АФО в рослинній клітині, механізми їх рецепції та трансдукції сигналу шляхом посттрансляційних модифікацій регуляторних білків, зв'язок з активацією систем захисту (антиоксидантної системи, осмолітів). Відзначено багатовекторність функціонування NO, дослідження якого у рослин прогресує в останні десятиріччя. Представлено шляхи

біосинтезу цієї сигнальної молекули в рослинних клітинах за окиснювальним і відновним шляхами. Окреслено реалізацію дії NO через різні посттрансляційні модифікації білків, показана роль цих реакцій у формуванні адаптивної відповіді рослин. Відзначено функціональний зв'язок NO з АФО.

В останній частині огляду автор наводить відомості щодо ГАМК як регуляторної молекули, в реалізації сигнального шляху якої важливі ролі можуть відігравати АФО, NO та іони кальцію. Детально описано шляхи біосинтезу ГАМК у рослин, підкреслено важливість ГАМК-шунта, який поєднує метаболізм амінокислоти із циклом трикарбонових кислот. Наведено численні факти участі ГАМК у захисних реакціях рослин на різних рівнях організації у відповідь на різноманітні стресові впливи – температурні зміни, водний дефіцит, засолення. Проаналізовано приклади позитивного впливу на стресостійкість рослин екзогенної ГАМК при різних способах її застосування – шляхом праймінгу насіння, додавання до поживного середовища та фоліарної обробки. Окремо розглядаються можливі механізми функціональної взаємодії ГАМК з АФО, кальцієвим гомеостазом та NO, і разом з тим відзначається, що наявні в літературі дані фрагментарні, а часто й суперечливі. Текстова частин огляду вдало доповнена схемами відповідних процесів із зазначенням ферментативних систем і клітинних компартментів. Розділ завершує узагальнення, в якому автор наголошує на важливості подальшого вивчення функціональних зв'язків ГАМК із АФО, NO та іонами кальцію як сигнальними посередниками, а також на необхідності з'ясування прикладних питань застосування ГАМК як екзогенного агенту для посилення стресостійкості рослин і покращення якості насіння.

Розділ 2 «Матеріали та методи досліджень» містить коротку характеристику досліджуваних сортів пшениці і тритикале, протоколів вирощування рослин у різних експериментах, умови створення стресових впливів – високої температури, водного дефіциту (13-15% ПЕГ 6000, грунтова посуха) і засолення (100 мМ і 150 мМ NaCl), джерела отримання низькоякісного насіннєвого матеріалу, протоколи обробки фізіологічно-активними сполуками. Описано методичні підходи до визначення

фізіологічних характеристик експериментальних рослин (ростові характеристики, виживаність, вміст води в тканинах). Для визначення ефектів АФО, іонів кальцію і нітроген оксиду використовувались інгібітори – диметилтіосечовина (скавенджер H_2O_2), імідазол (інгібітор НАДФН-оксидази), ЕГТА (хелатор кальцію), неоміцин (інгібітор утворення інозитол-1,4,5-фосфату, який перешкоджає вивільненню кальцію до цитозолю з внутрішньоклітинних депо), метиленовий синій (скавенджер NO), а також донор NO нітропрусид натрію. Наведено опис методик визначення біохімічних показників (вміст NO, супероксидного аніон-радикала, гідроген пероксиду і малонового діальдегіду; активність антиоксидантних ферментів СОД, каталази і гваяколпероксидази; активність амілази; вміст розчинних вуглеводів, проліну, фенольних речовин, антоціанів). Наведено відомості про повторність експериментів і статистичну обробку результатів.

Розділи 3-5 представляють результати експериментальної роботи. У розділі 3 автор окреслює експериментальні підходи дослідження: вибір основної робочої концентрації ГАМК, вибір зернових культур – пшениці і тритикале як модельних об'єктів, вибір високої температури, посухи та засолення як важливих абіотичних стресових факторів для агрокультур. Зокрема, 0,5 мМ ГАМК виявилася найбільш ефективною з широкого діапазону концентрацій за її здатністю посилювати виживаність проростків пшениці після потенційно летальної теплової експозиції та підвищувати ростову активність за водного дефіциту. Показано її здатність підтримувати водний баланс рослинних тканин за умов водного дефіциту, високої концентрації солі в середовищі та комбінації факторів. Продемонстровано, що тритикале та різні за стресостійкістю сорти пшениці є зручною моделлю для дослідження механізмів дії ГАМК у посиленні стійкості злаків до високої температури, посухи і засолення.

У розділі 4 наведено результати вивчення ролі сигнальних посередників і стрес-протекторних систем у посиленні стійкості злаків до стресових факторів. Показано, що додавання в середовище ГАМК призводило до швидкого короткочасного (з максимумом на 1 год) зростання вмісту гідроген

пероксиду в коренях проростків пшениці. Подальша нормалізація вмісту гідроген пероксиду, за припущенням дисертанта, пов'язана з активацію антиоксидантної ферментної системи, що він підтвердив для супероксиддисмутази, каталази і гваяколпероксидази. Крім того, екзогенна ГАМК знижувала ступінь ушкодження клітинних мембран. За допомогою інгібіторного аналізу показано, що ефект ГАМК значною мірою залежить від генерації АФО і моделюється іонами кальцію.

При вивченні реакції етіольованих проростків пшениці на водний дефіцит, створюваний ПЕГ 6000, автором продемонстровано здатність ГАМК пом'якшувати негативний вплив окиснювального стресу завдяки стабілізації ряду захисних механізмів. Теоретичний і практичний інтерес представляють результати щодо особливостей впливу ГАМК у сортів різної посухостійкості. За низкою показників (активність гваяколпероксидази, вміст проліну, загальний вміст фенольних сполук) обробка ГАМК була ефективною в чутливого до посухи сорту Досконала, проте мало впливала на ці показники у стійкого сорту Тобак. Порівняння фоліарної обробки ГАМК пшениці з праймінгом зернівок переконливо довело, що обробка зернівок була ефективнішою, зокрема за умов водного дефіциту.

Дисертантом вперше показана здатність ГАМК підвищувати стійкість тритикале у раньому розвитку до водного дефіциту, засолення та комбінованої дії цих чинників. Встановлено, що зниження рівня окиснювального стресу в етіольованих проростках тритикале під впливом ГАМК супроводжувалося підвищенням активності антиоксидантних ферментів і збільшенням вмісту осмолітів, фенольних сполук і антоціанів. Високий ступінь кореляції визначених у розділі показників дозволив дисертанту зробити важливий висновок щодо системної дії ГАМК у сигнальній мережі рослинних клітин із залученням АФО й іонів кальцію.

Розділ 5 присвячений результатам низки експериментів з перевірки власної гіпотези дисертанта щодо здатності ГАМК шляхом праймінгу насінневого матеріалу «сприяти активації процесів, важливих для проростання насіння, росту проростків і контролю про-/антиоксидантної

рівноваги в стресових умовах». Встановлено, що праймінг ГАМК зернівок пшениці суттєво посилював проростання за умов водного дефіциту і засолення, сприяв збереженню води в тканинах, знижував рівень окиснювального стресу та покращував стан антиоксидантної та осмопротекторної систем. Виявлено певну специфічність дії амінокислоти, зокрема через модуляцію активності гваяколпероксидази та підтримку накопичення розчинних цукрів. При цьому автор припускає, що пряма кореляція активності гваяколпероксидази із вмістом H_2O_2 і малонового діальдегіду може вказувати на прооксидантну дію ферменту. Проте не можна виключати й іншого характеру причинно-наслідкових зв'язків у даному випадку: окиснювальний статус клітин може визначати рівень активності ферменту.

На прикладі проростання оброблених ГАМК зернівок пшениці за умов водного дефіциту з використанням різних експериментальних підходів (скавенджера NO, донора NO і визначення вмісту NO в тканинах) дисертантом отримано пріоритетні результати щодо участі нітроген оксиду як сигнального посередника в реалізації ефектів екзогенної ГАМК у стимулюванні проростання та формуванні посухостійкості рослин в ранньому онтогенезі. Виявлено збільшення ендогенного вмісту NO у пагонах в результаті обробки ГАМК. Встановлено, що праймінг зернівок ГАМК за участі NO призводить до підвищення активності амілази при проростанні та вмісту розчинних вуглеводів у проростках, відбувається активація біосинтезу вторинних метаболітів – фенольних сполук і антоціанів. Примітно, що в цьому випадку обидва агенти не впливали на стрес-залежне збільшення рівня проліну, що підтверджує думку про певну специфічність їх функціонування.

Важливу прикладну перспективу мають результати щодо здатності праймінгу ГАМК стимулювати проростання зернівок пшениці і тритикале зі зниженою схожістю, викладені в останньому підрозділі розділу 5. Шляхом порівняння з дією інших альфа-амінокислот автор доводить специфічність ефектів ГАМК. Показано зменшення інтенсивності окиснювального стресу,

що супроводжувалося підвищенням активності каталази та посиленням синтезу вторинних метаболітів із антиоксидантними властивостями.

Для аналізу кількісних даних автор вдало використав методи статистичного аналізу (аналіз кореляцій, метод головних компонент), узагальнення змін кількісних даних наочне представлено за допомогою теплових карт змін показників. В обговоренні отриманих даних використано релевантні джерела, основна частина яких опублікована в останні роки. Автор окреслює питання, що витікають з аналізу результатів і створюють перспективи розвитку дослідження за темою у майбутньому.

Разом з тим до дисертаційної роботи є деякі зауваження:

1. Автор роботи, як і багато інших дослідників, визначає стрес як «несприятливий вплив» (с. 32 і далі). Проте вважаю за необхідне наголосити на тому, що за класичним визначенням Ганса Сельє, стрес - це неспецифічна системна реакція організма на гостру дію шкідливих агентів різної природи (Selye, 1936). Тобто стрес – це реакція на фактор (стресор), а не власне несприятливий фактор.
2. Аналіз тексту дисертації продемонстрував загальну проблему, що існує у вітчизняній біологічній літературі: використання абревіатури українських назв для одних молекул (наприклад, *ГАМК*, *АФО*, *НАДФ-оксидаза*), і абревіатури англійських назв для інших (наприклад, на с. 50: глутаматдекарбоксилаза (*GAD*), дегідрогеназа янтарного напівальдегіду (*SSADH*), ГАМК-*permease* тощо). Проте це скоріше не зауваження до дисертанта, а питання до всієї спільноти українських біологів. І однозначної відповіді в мене на це немає, оскільки постійно стикаюся з цією проблемою у власній роботі.
3. Варто відзначити використання різних сортів пшениці в різних експериментах, що, очевидно, є наслідком виконання дисертаційного дослідження в рамках різних тем, проте може бути джерелом значної варіабельності результатів і не дає можливості строгого порівняння даних різних частин роботи.

4. В описі результатів експериментів з пшеницею і тритикале автор часто використовує слово «насіння», хоча з ботанічної точки зору в даному випадку правильно було б говорити про «зернівки».
5. В розділі 2 в описі постановки експериментів з дослідження участі сигнальних сполук у реалізації фізіологічних ефектів ГАМК (с. 67) вказано, що в нові чашки Петрі переносили 3-добові проростки, проте далі йдеться про середовище інкубації коренів. Варто пояснити, що саме мається на увазі під середовищем інкубації саме коренів в чашках Петрі.
6. В підрозділі 4.3 (рис. 4.21) наведено дані вмісту розчинних білків, проте відповідної методики у розділі 2 не описано.
7. Оскільки різні експерименти мали особливості щодо вирощування рослин, проведення обробок і відбору рослинного матеріалу, було б корисно на початку опису результатів експерименту коротко окреслити основні експериментальні підходи або надати схему і пояснити використання кореневої або стеблової частини рослин для характеристики стресостійкості проростка.
8. У підрозділі 3.3 (с. 80) текст щодо результатів, представлених на рис. 3.4, детально описує зміни біомаси органів проростків тритикале за дії стресорів. Проте вплив ГАМК згадується лише за нормальних умов, залишаючи нам самостійно аналізувати діаграму 3.4 А.
9. У підрозділі 5.1 (с. 133) автор пише «Обробка розчинами ГАМК насіння, яке не зазнало впливу стресу, суттєво не вплинула на біомасу пагонів пшениці, але збільшила біомасу коренів (рис. 5.2)», проте на рис. 5.2 зміни маси і коренів, і пагонів позначені як статистично недостовірні. Отже, можна говорити лише про тенденцію.
10. В роботі використано два види зернових злаків – пшеницю і тритикале, в обох видів вивчали вплив ГАМК за умов водного дефіциту. Порівняння видів між собою, зокрема за їх реакцією на обробку ГАМК, певною мірою збагатило б дослідження, проте в тексті відсутнє.
11. Загалом дисертація написана якісною українською науковою мовою, і разом з тим трапляються окремі граматичні помилки і невдалі вирази,

наприклад: «*акліматація*» (с. 45); «Найбільш поширеним і важливим способом ПТМ білків *нітроген оксидом азоту* є вибіркове S-нітрозування *залишків цистеїнових білків*» (с. 45); «синтез і метаболізм ГАМК» (с.52) – метаболізм складається із шляхів біосинтезу і катаболізму речовин.

12. До технічних недоробок можна віднести: на рисунку 4.5 – дві частини В; на рисунку 4.7 – нестандартне розташування частин А і Б; рисунки 5.8 – 5.14 – варіант 6 в підписах представлений як НПН, хоча з контексту слідує, що в середовищі проростання був присутній також ПЕГ (наприклад, с. 141 «При обробці насіння НПН спостерігалася тенденція до пом'якшення негативного впливу посухи, проте зміни не були статистично значимими»).

Проте наведені зауваження жодним чином не зменшують загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

За матеріалами дисертації опубліковано: 7 статей (6 у журналах, що індексуються у наукометричних базах Scopus і WoS); 6 публікацій у матеріалах наукових форумів; 3 публікації науково-методичних рекомендацій, що в цілому показує високий рівень апробації дослідження.

Формальний аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушень автором вимог академічної доброчесності. Наведені ідеї і результати інших авторів мають посилання на джерело, що відповідає вимогам норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації та фальсифікації. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи.

Загальний висновок. Дисертаційна робота ШАХОВА Івана Валерійовича «Механізми стрес-протекторної дії γ-аміномасляної кислоти на зернові злаки» є актуальним самостійним завершеним науковим дослідженням, яке за обсягом, новизною і практичним значенням відповідає вимогам відповідає вимогам Наказу Міністерства освіти і науки України «Про затвердження вимог до оформлення дисертації» від 12 січня 2017 року №40 (зі

змінами, внесеними згідно з Наказом МОН України від 31.05.2019 р. № 759) та постанови Кабінету Міністрів України «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» від 12 січня 2022 року № 44 (в редакції постанови Кабінету Міністрів України від 3 травня 2024 року №507), а її автор Шахов Іван Валерійович заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Завідувачка відділу клітинної біології та анатомії
Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
д.б.н., с.н.с. Л.Є. Козеко

Підпис Козеко Л.Є.
Засвідчую
Відділ кадрів

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ім. М.Г.Холодного НАН України
КИЇВ
ВІДДІЛ КАДРІВ