

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу **ГОРЕЛОВОЇ ОЛЕНИ ІВАНІВНИ**

«Антиоксидантна і осмопротекторна системи злаків
при адаптації до гіпотермії»,

представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи. Низькі температури взимку є одним з головних абіотичних стресів, що спричиняє значні втрати врожаю багатьох сільськогосподарських культур. Недостатня стійкість сортів сільськогосподарських рослин до дії низьких температур може призводити до значних втрат врожаю в роки з особливо несприятливими умовами. Формування стійкості рослин до стресових чинників, в тому числі до гіпотермії, пов'язане з активуванням комплексу захисних механізмів, що відповідають за збереження життєздатності та перебудову метаболізму рослини за екстремальних умов. Важлива роль у формуванні протекторних механізмів рослин належить антиоксидантній та осмопротекторній системам. Комплексних порівняльних досліджень антиоксидантної та осмопротекторної систем рослин різних злакових культур при адаптації до гіпотермії та можливостей індукування цих протекторних систем рослин при кріостресі екзогенними сигнальними молекулами (газотрансмітерами, фітогормонами) дотепер не проводилося. Узагальнені експериментальні дані за цими напрямками досліджень можна буде застосовувати при вирішенні дослідницьких завдань фундаментального і прикладного значення, спрямованих на розробку агротехнологій з підвищення стійкості рослин до низьких температур. Зважаючи на це, дисертаційна роботи Горелової Олени Іванівни, основною метою якої була оцінка ролі компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур та дослідження індукування цих систем дією донорів газотрансмітерів (NO і H_2S) і саліцилової кислоти є дуже актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами темами.

Дисертаційна робота виконувалася в рамках проєкту «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (2017-2019 рр., номер державної реєстрації 0117U002427), що фінансувався за рахунок коштів державного бюджету відповідно до тематичного плану наукових досліджень ХНАУ ім. В.В. Докучаєва та науково-дослідної теми кафедри ботаніки і фізіології



рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (2016-2020 рр., номер державної реєстрації 0117U002514).

Структура дисертації. Дисертація Горелової О.І. має класичну структуру і складається з анотації, вступу, шести розділів (огляд літератури, опис об'єктів і методів досліджень, чотири експериментальні розділи), узагальнення результатів досліджень, висновків. Робота викладена на 165 сторінках, ілюстрована 24 рисунками, містить 14 таблиць. Список цитованої літератури налічує 295 джерел, з яких значна частина за останні 5-10 років та англomовні 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 проблеми морозостійкості злаків в контексті сучасних змін клімату, основних реакцій рослин на дію низьких температур, зокрема ефекти низьких температур на субклітинному і клітинному рівнях, посилення утворення АФК у рослин за умов гіпотермії, сприйняття і передачу холодового сигналу, антиоксидантну систему та її роль в низькотемпературній адаптації, можливості підвищення стійкості рослин до гіпотермії дією екзогенних сигнальних сполук і фітогормонів. Дисертантка виділила існуючі проблемні та малодосліджені питання. Зокрема, О.І. Горелова приділила увагу недостатньому дослідженню особливостей адаптації до низьких температур жита, яке відрізняється від пшениці вищою морозостійкістю, механізмам формування морозостійкості у тритикале. Дисертантка підкреслила, що не встановлено ще чіткого зв'язку між показниками стану антиоксидантної системи і морозостійкістю, недостатньо вивчені особливості взаємодії між компонентами антиоксидантної та осмопротекторної систем за умов холодової адаптації у різних видів злаків. Автором також було відзначено, що останнім часом значна увага приділяється пошуку ефективних способів праймування рослин і насіння – індукуванню стійкості дією сигнальних молекул або їх донорів (зокрема газотрансмітерів – оксиду азоту (NO) і сірководню (H₂S), а також стресового фітогормону саліцилової кислоти). Однак їх вплив на морозостійкість рослин і перебіг процесу холодового загартування вивчався лише в поодиноких дослідженнях, що не передбачали порівняння реакцій різних видів рослин на ці чинники. Всі ці не вирішені 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.), жита посівного (*Secale cereale* L.), тритикале (\times *Triticosecale* Wittmack), описані фізіологічно активні речовини, якими обробляли рослинні об'єкти та умови проведення дослідів (кріостресу, холодового загартування).

Відповідно до поставлених мети і завдань дисертантка використовувала сучасні фізіологічні (загартування рослин в лабораторних і природних умовах та оцінка їх стану); біохімічні (аналіз активності антиоксидантних ферментів, фенілаланінамонійліази; вмісту сумісних осмолітів і вторинних метаболітів); статистичні (нормування показників антиоксидантної активності, 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 особливостей функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем жита, тритикале і пшениці у звичайних умовах і за холодового загартування. О.І. Горелова проведеними дослідження засвідчила, що в антиоксидантний захист жита більший внесок вносять висока активність пероксидази та вміст проліну, а у тритикале – підвищений вміст флавоноїдів і цукрів. У той же час у пшениці під час холодової адаптації більш істотно змінювалася активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і каталази. Отримані результати дозволили автору зробити висновок, що підвищений вміст одночасно проліну і цукрів у жита і цукрів у тритикале може бути однією з причин їх вищої порівняно з пшеницею морозостійкості.

У розділі 4 проведено дослідження зв'язку між вмістом низькомолекулярних протекторів з антиоксидантними властивостями, активністю ключових антиоксидантних ферментів, резистентністю до окиснювального стресу і морозостійкістю сортів тритикале. Для цього дисертантка використовувала чотири сорти тритикале з різною морозостійкістю: Букет і Раритет (озимі високоморозостійкі), Олександра (озимий неморозостійкий) та Підзимок харківський (неморозостійкий, що належить до «дворучок»). Отримані дисертанткою результати свідчать про відсутність чітких зв'язків між величинами окремих показників стану антиоксидантної системи і морозостійкістю сортів тритикале і вказують на необхідність пошуку інтегральних маркерів стану цієї системи.

У розділі 5 наведено експериментальні дані по дослідженню зв'язків між окремими та інтегральними показниками стану антиоксидантної системи жита, пшениці і різних генотипів тритикале та морозостійкістю етіологованих проростків і зелених рослин у фазі кушіння. Дисертанткою було встановлено, що між морозостійкістю загартованих проростків і дорослих рослин пшениці, жита і тритикале існує достатньо висока кореляція ($r = 0,78$,

$P \leq 0,07$), не виявлено чіткого зв'язку між окремо взятими показниками функціонування антиоксидантної системи у незагартованих проростків та морозостійкістю загартованих проростків. Автором було показано, що після загартування відзначається висока кореляція сумарного нормованого показника ферментативної антиоксидантної системи з морозостійкістю ($r = 0,83, P \leq 0,05$), проте коефіцієнт кореляції цього показника з морозостійкістю рослин у фазі кушіння був значно нижчим і невірогідним ($r = 0,53$). Гореловою О.І. водночас виявлено високу кореляцію між вмістом низькомолекулярних протекторів у загартованих проростках і морозостійкістю дорослих рослин у фазі кушіння ($r = 0,88, P \leq 0,05$). Викладені у розділі результати досліджень дали підстави зробити автору висновок, що найвища кореляція відзначається між інтегральним нормованим показником, що складався з суми нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних протекторів у загартованих проростках, і морозостійкістю проростків ($r = 0,94, P \leq 0,01$) та рослин у фазі кушіння ($r = 0,90, P \leq 0,05$).

Розділ 6 присвячено вивченню впливу донорів сірководню і оксиду азоту, а також комбінованої дії донора NO і саліцилової кислоти на стан антиоксидантної і осмопротекторної систем проростків злаків. Дисертанткою було показано, що донори газотрансмітерів H_2S та NO, а також стресовий фітогормон саліцилова кислота можуть чинити кріопротекторний вплив на злаки, посилюючи функціонування антиоксидантної та осмопротекторної систем за умов адаптації рослин до холоду. Автором було відзначено, що за сумісної дії саліцилової кислоти і НПН їх стрес-протекторні ефекти посилюються, показана здатність екзогенних газотрансмітерів і саліцилової кислоти істотно посилювати накопичення в проростках досліджених злаків мультифункціональних протекторів – цукрів і проліну.

Після експериментальних розділів наводиться аналіз і узагальнення результатів досліджень. В рамках єдиного комплексного дослідження показано важливе значення компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем у жита, пшениці і тритикале в їх адаптації до низьких температур, встановлено видові та сортові особливості функціонування цих систем і доведена можливість їх активації та підвищення морозостійкості рослин шляхом застосування екзогенних газотрансмітерів (сірководню і оксиду азоту) та фітогормону саліцилової кислоти. Зокрема, у дисертаційній роботі Горелової О.І. встановлено, що найбільш тісна кореляція існує між інтегральним нормованим показником,

що включав в себе суму нормованих величин активності антиоксидантних ферментів та вмісту низькомолекулярних сполук у загартованих проростках і морозостійкістю проростків ($r = 0,94$) та рослин у фазі кущіння ($r = 0,90$). Дисертанткою також показано, що обробка донорами оксиду азоту і сірководню, а також екзогенною саліциловою кислотою особливо помітно посилювала накопичення низькомолекулярних сполук з мультифункціональною (осмопротекторною, мембранозахисною і антиоксидантною) дією – проліну, цукрів і флавоноїдів.

Наукова повизна роботи. Гореловою О.І. вперше проведено комплексне дослідження антиоксидантної системи озимих жита, пшениці і тритикале у фізіологічно нормальних умовах і за холодового загартування. Дисертанткою вперше показано, що в антиоксидантний захист рослин жита більший внесок роблять високі рівні активності пероксидази та вмісту проліну і антоціанів, а у тритикале – підвищений вміст флавоноїдів і цукрів, у пшениці після холодової адаптації істотно змінюється активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і каталази. Вперше автором досліджено особливості функціонування стрес-протекторних систем проростків сортів тритикале з різною морозостійкістю. Гореловою О.І. запропоновано використовувати для оцінки антиоксидантної системи злаків інтегральний нормований показник, що розраховується на основі нормованих величин активності антиоксидантних ферментів і вмісту низькомолекулярних захисних сполук, встановлено наявність високої кореляції між інтегральними показниками антиоксидантної активності і морозостійкістю як загартованих проростків, так і дорослих озимих злаків у фазі кущіння. Дисертанткою вперше встановлено позитивний вплив донора сірководню NaHS на стійкість проростків озимої пшениці та жита до дії від'ємних температур і показано значення індукції окремих антиоксидантних ферментів, фенілаланінамонійліази, накопичення проліну і флавоноїдів у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного сірководню. Гореловою О.І. виявлено підвищення морозостійкості озимих злаків внаслідок обробки насіння донором оксиду азоту нітропрусидом натрію, саліциловою кислотою та їх комбінацією та показано, що посилення протекторних ефектів саліцилової кислоти за комбінування її дії з донором NO супроводжується значним підвищенням активності супероксиддисмутази і вмісту цукрів у проростках злаків.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертації О.І. Горелової мають значну перспективу щодо практичного використання. Так, виявлені автором кореляції між інтегральними показниками стану

антиоксидантної системи та морозостійкістю сортів озимих злаків можуть використовуватися для розробки нових методів оцінки матеріалу при селекції на морозостійкість. Викликає практичний інтерес встановлений дисертанткою ефект індукування стрес-протекторних систем злаків шляхом праймування донорами газотрансмітерів і саліциловою кислотою, що може стати основою для створення нових технологій підвищення стійкості злакових рослин до гіпотермії та інших несприятливих чинників. Отримані Гореловою О.І. дані щодо відмінностей у функціонуванні стрес-протекторних систем пшениці, жита та тритикале при адаптації до гіпотермії мають важливе значення для розуміння фундаментальних механізмів адаптації рослин з різною таксономічною належністю.

Результати досліджень використовуються в наукових дослідженнях Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, у навчальному процесі в ХНАУ ім. В.В. Докучаєва і ХНУ ім. В.Н. Каразіна при викладанні загальних і спеціальних курсів. Вони можуть бути використані у навчальному процесі та при проведенні фундаментальних і прикладних досліджень в інших закладах вищої освіти і наукових установах.

Узагальнені експериментальні дані можна застосовувати при вирішенні дослідницьких завдань фундаментального і прикладного значення, спрямованих на підвищення стійкості рослин до несприятливих абіотичних факторів, зокрема до кріостресу, для створення нових методів підвищення неспецифічної стійкості, заснованих на включенні власних захисних механізмів рослин.

Дисертаційна робота викладена дуже логічно, добре оформлена, вдало проілюстрована таблицями і рисунками, написана хорошою науковою українською мовою. 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 Гореловою О.І. опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 9 статей у провідних фахових виданнях України та інших країн, з них дві у журналах, що входять до міжнародної наукометричної бази "Scopus".

Робота апробована шляхом обговорення результатів дослідження на наукових семінарах кафедри ботаніки і фізіології рослин, підсумкових звітних конференціях професорсько-викладацького складу і здобувачів

ХНАУ ім. В.В. Докучаєва (2017–2020 рр.), участі автора у міжнародних конференціях.

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

Зауваження по дисертації:

1. В дисертації встановлено вплив кріостресу та газотрансмітерів оксиду азоту (NO) і сірководню (H_2S), саліцилової кислоти на активність ензимів (супероксиддисмутази, каталази, пероксидази, фенілаланінамонійліази) та вміст цукрів, флавоноїдів, проте не досліджено зміни ізоферментного складу ензимів та компонентного складу цукрів та флавоноїдів за дії цих чинників, хоча відомо, що активність різних ізоформ ензимів та кількість окремих цукрів і флавоноїдів неоднакова у різних видів, органах рослин, а також змінюється у процесах розвитку та за умов стресів, при цьому різні ізоформи ензимів та окремі цукри і флавоноїди можуть вносити різний вклад у формування стійкості рослин до несприятливих чинників середовища.

2. У розділі 2 дисертантка вказує, що вміст проліну визначали за методом Бейтса зі співавт. (Bates et al., 1973). Згідно з цим методом визначається вміст вільного проліну, який, як відомо, в значній мірі пов'язаний з морозостійкістю рослин. Але в роботі не вказано, що визначали та досліджували саме “вільний пролін”.

3. При опису методики визначення флавоноїдів у розділі 2.4.4 не указано, що екстрагували та визначали саме флавоноїди, а у результатах досліджень у розділі 3 (на рис.3.3) вміст флавоноїдів та антоціанів представлено у величинах оптичної густини розчинів на г/сирої маси, в той час як у розділі 4 на рис. 4.4 та 4.5. вміст флавоноїдів представлено у мкмоль рутину/г сухої речовини, а вміст антоціанів - у мкмоль піанідину/г сухої речовини). Бажано, щоб в методиці та у результатах досліджень вміст флавоноїдів було представлено в одних одиницях виміру (в перерахунку на мг/г або в % з використанням стандартних речовин флавоноїдів).

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

5. У роботі трапляються технічні помилки й невдалі вирази. Наприклад, на стор. 5 в “Анотації” **“Виразного** зв'язку між окремо взятими показниками функціонування антиоксидантної системи та морозостійкістю не виявлено”, стор.33 **“ може бути складовою тпередачі** холодового сигналу”, стор.33 **“індукувати відкриття механочутливих кальцієвих каналів”**, стор. 40 **“**

1.3.2.Альтернативна оксидаза каталізує **окисування убіхіноле...** , стор.43
 “**Етсольовані** проростки жита”, стор. 45 “При цьому підвищена стійкість **забезпечвалася...**”,стор.46 “У рослин *Jatropha curcas* **зафіксована** вища експресія гена...”, стор.49 “ Зокрема за впливу **гіпотремії** в органах...”, стор. “Основним **ферментатом**, що генерує NO...”, стор.58 “*Тритикале дворечка...*”,стор.61 (немає шифра фенілаланінамонійліази), стор. 63 “*Загальний вміст фенольних сполук* визначали за допомогою реактиву **Фоліна**”(Фоліна-Деніса?), стр.72 “Як зазначалося, поряд з осмопротекторними, антиденатураційними і мембранопротекторними властивостями **цукрів притаманні і антиоксидантні властивості...**”, стор.73 “Підвищення загального **змісту** флавоноїдів зареєстровано...”, стор.78 У позначеннях на рисунку 4.1(В) та на стор.102, рис. 6.1.(В) замість пероксидази написано ГПО, стор.79 “У **незагартованих** проростків вищі в порівнянні з іншими сортами значення вмісту проліну спостерігалися у сорту Раритет...”, стор. 80 “Після загартування він збільшувався в усіх сортів, однак у сорту Олександра **величини були істотно нижчим**, ніж у трьох інших сортів”, стор. 88 (табл. 5.2) не вказані одиниці активності ферментів, стор. 89 (табл.5.3) не вказані одиниці виміру флавоноїдів, проліну, цукрів, стор. 99 “Попередня обробка NaHS вірогідно збільшувала відсоток **виживаність** проростків жита”, стор. 105 “зафіксовано підвищення загального **змісту** фенольних сполук...”, стор.112 “ Зокрема, дотепер не вивчався **плив** NO на ці процеси накопичення”, стор.113 “Обробка насіння жита і пшениці продуктами **світлоіндукованого** розкладання НРН”, “Після заморожування вміст МДА в проростках **збільшувалася**, особливо помітно це виявлялося у менш морозостійкої пшениці”, стор. 116 “Праймування НРН при рості проростків за контрольних температурних умов викликало помітне підвищення **кількості кількості** вторинних метаболітів в обох видів”, стор.132 “Можливо, праймування насіння, змінюючи гормональний баланс на початкових фазах розвитку рослин, запускає певний «набір фізіологічних програм», що реалізується впродовж **онотогенезу**”.

Вказані недоліки жодним чином не впливають на загальну позитивну оцінку роботи. Дисертаційна робота О.І. Горелової є самостійною завершеною цілісною науковою роботою з наявністю новизни і практичного значення. В дисертаційній роботі відсутні порушення академічної доброчесності. При використанні ідей, розробок і тверджень інших авторів у роботі містяться посилання на відповідні джерела, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У дисертаційній роботі не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації.

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 ГОРЕЛОВОЇ Олени Іванівни повністю відповідає вимогам «Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 р., 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 насіннезнавства

та сортовивчення




О.О. Молодченкова

25.08.2021 р.

Підпис Молодченкової О. О. засвідчую

Вчений секретар
СГІ – НЦС



 Пушкаренко О. Я.