

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Булавина Іллі Володимировича “Особливості морфогенезу коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. в культурі *in vitro* в умовах кліноостатування”, представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю цитологія, клітинна біологія, гістологія – 03.00.11

Актуальність теми роботи

Кандидатська дисертація Булавина І.В. присвячена вивченню ризогенезу *Arabidopsis thaliana in vitro*, а саме в калусній культурі та на листкових експлантах дикого типу, *scr* мутанта та трьох ліній трансгенних рослин в стаціонарному контролі та під впливом горизонтального повільного кліноостатування, що є визначальним для з'ясування механізмів гравічутливості/гравізалежності процесів органогенезу, адаптації рослин до впливу мікрогравітації та основою розробки технологій їх вирощування в умовах космічного польоту. Запропонована модель ризогенезу в культурі *in vitro* дає можливість уникнути дії гравітації на перші клітинні поділи під час утворення зачатків коренів для досліджень впливу реальної та симульованої мікрогравітації на морфогенез та диференціацію спеціалізованих і не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу клітин. Тому тема дисертаційної роботи є актуальною, а доцільність таких досліджень є незаперечною та своєчасною, особливо у зв'язку з можливістю її використання в наземних і космічних експериментах.

Офіційно дисертаційна робота виконувалася відповідно до фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Аналіз структури дисертації та результатів наукових досліджень

Робота викладена на 159 сторінках друкованого тексту з 9 таблицями, 36 рисунками і складається зі вступу, семи розділів, узагальнення, висновків, списку використаних джерел, який містить 254 посилання, та додатка.

У вступі роботи висвітлено актуальність теми, мету, завдання роботи, зв'язок з науковими темами, об'єкт, предмет і методи досліджень, наукову новизну та практичне значення, розкрито особистий внесок автора та апробацію результатів роботи.

Метою роботи було дослідити морфогенез та структурно-функціональну організацію клітин коренів *Arabidopsis thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, утворених *de novo* в культурі *in vitro* в умовах кліноостатування. З поставленої мети логічно сформульовані автором конкретні завдання. Об'єктом дослідження є морфогенез і гравічутливість коренів, сформованих *de novo* в культурі *in vitro* за умов кліноостатування. Предмет дослідження – вплив кліноостатування на анатомічну будову коренів, ультраструктуру клітин, цитоскелет і розподіл ауксину у кореновому апексі.

Наукова новизна, практичне значення та інші підпункти вступу наведені на належному науковому рівні.

Проте у меті взагалі не згадано про трансгенні рослини, чому?

У першому розділі “Біологічні ефекти умов реальної мікрогравітації та клінонстатування (модельованої мікрогравітації)”, який містить п’ять підрозділів, представлено відомості з літературних джерел щодо впливу умов реальної та модельованої мікрогравітації на анатомію рослин, ультраструктуру клітин, організацію актинового та тубулінового цитоскелета, розподіл ауксину переважно у зародкових коренях, що утворилися з насіння в умовах 1g, а також про морфогенетичний потенціал рослинних тканин *in vitro*.

Розділ 2 “Матеріали та методи” характеризує особливості рослинного матеріалу, використаного у дослідженнях, різнопланові методи та методичні прийоми для культивування листкових експлантів і калусної тканини, моделювання повільного горизонтального клінонстатування та аналізу структурно-функціональної організації ризогенезу *in vitro*.

У розділі нечітко описані умови досліджень на клінонстаті (як освітлювали культуру, тривалість клінонстатування); не розшифровані назви трансгенних рослин і не деталізовано методуку отримання з них коренів.

У розділі 3 “Дослідження моделей ризогенезу *in vitro* в контролі” наведено результати дослідження умов та частоти індукції ризогенезу *de novo* з калусної тканини листкових експлантів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, залежність морфогенетичного потенціалу коренів від розміру та віку. Охарактеризовано якісні та кількісні відмінності в анатомічній будові коренів *in vivo* та *in vitro*.

Проте дисертант у підрозділі 3.2 не обґрунтував відмінності морфогенетичного потенціалу експлантів залежно від їх віку, розміру та положення у площині живильного середовища, асиметричність і генетичну детермінованість різних поверхонь листка. У дисертації досить часто не має пояснень для скорочень, зокрема у розділі (стор. 61) не розшифровано середовище B5.

*У підрозділі 3.3 варто було подати фотографії загального вигляду кореня *A. thaliana* дикого типу і мутанта. Не зайвою була б детальніша характеристика “мозаїчності” його клітинних поділів – частота поперечних поділів, розміри клітин перед поділом і т.д.*

*Потрібно уточнити назви табл. 3.3 і 3.5: замість – “Кількісні анатомічні ознаки ростових зон *A. thaliana* дикого типу”, краще було б: “Морфометричні параметри ростових зон...”; та замінити “Ростові показники зародкових коренів та отриманих з калусу” на: “Ростові показники коренів зародкових та отриманих з калусу”.*

У розділі 4 “Анатомія коренів при дії клінонстатування” проаналізовано відмінності довжини ростових зон, кількості клітин епідерми та їхніх площ у коренях *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, які утворилися на листкових експлантах в контролі та в умовах клінонстатування. Повністю підтверджено диференціацію клітин коренів в двох напрямках: кореневого чохла та ростових зон власне кореня під дією клінонстатування.

Оскільки достовірних даних про порушення розвитку коренів в умовах зміненої гравітації не отримано, за винятком збільшення кількості клітин у

меристематичній зоні унаслідок активації поділів, вважаю зайвим дублювання морфометричних показників у тексті (стор. 74) та таблиці 4.1 (стор. 75).

Розділ 5 “Ультраструктура гравірецепторного апарату кореневого чохла та ростових зон кореня” присвячений порівняльному аналізу структури коренів *A. thaliana* дикого типу та *scr* мутанта, сформованих *de novo in vitro* у стаціонарних умовах і під час кліноостатування. Встановлено подібність досліджених ознак і ступеня гравічутливості гравірецепторних клітин чохла та ростових зон власне кореня, неспеціалізованих до сприйняття гравітації, із клітинами зародкових коренів проростків. На підставі аналізу ультраструктури апексів коренів показано завершену диференціацію гравірецепторних клітин *in vitro*. Оскільки визначено достовірні зміни розмірів мітохондрій у клітинах протодерми та мітохондрій, ER-тілець, ступеня вакуолізації в клітинах епідерми ДЗР зроблено висновок, що такі органели є чутливими до дії кліноостатування.

На стор. 82 і 83 повторюється опис диктіосом, в обох випадках вказано, що “диктіосоми характеризуються полярністю”, але жодних відмінностей не представлено. У підрозділі 5.2 (рис. 5.23 і 5.24 та таблиця 5.1) наведено дані про парціальний об’єм органел (%) у клітинах протодерми, утворених *in vitro*, та середню площу зрізів органел у клітинах протодерми та епідерми ДЗР, проте методики цих аналізів не подано.

У розділі 6 “Орієнтація елементів актинового та тубулінового цитоскелета в клітинах коренів, сформованих *de novo* в умовах кліноостатування” представлено результати дослідження організації цитоскелету в клітинах коренів, уперше регеноерованих з листкових експлантів трансгенних рослин *A. thaliana* FABD2-GFP та *A. thaliana* GFP-MAP4. Показано, що, на відміну від актинового цитоскелету, орієнтація якого не змінювалася в коренях *A. thaliana* GFP-FABD2 *in vitro*, порівняно із контролем, в клітинах коренів *A. thaliana* GFP-MAP4 встановлено зміни орієнтації гравічутливіших мікротрубочок в клітинах ДЗР за умов модельованої мікрогравітації, що впливає на структуру поздовжніх клітинних стінок цієї зони.

У розділі необхідно було обговорити участь актинових філаментів у модуляції транспорту ауксину та його переносників (білків родини PIN). Чим обумовлена різна орієнтація актину в протодермі і епідермі – ауксином чи розміщенням органел? Також слід було звернути увагу, які МФ (довгі, короткі, радіальні) огортають статоліти у контролі, а які під час кліноостатування, бо це має значення для осідання пластид. У літературі (Blancaflor, 2013) така організація цитоскелету розглядається як спроба раціонально визначити сили, що впливають на гравізалежне седиментацію статолітів і тиск на мембрани.

У підрозділі 6.2 дисертант пов’язує хвилястість поперечних та потоншення поздовжніх клітинних стінок в ДЗР як із змінами в орієнтації тубулінового цитоскелету, так і везикулярного транспорту за участю актинового цитоскелету. На мою думку, можна було показати на підставі проведеного ультраструктурного аналізу зміни у кількості диктіосом, щільності ER та елементів цитоскелету біля клітинних стінок залежно від їх структурно-функціональної організації.

Чи допускає автор, що хвилястість клітинних стінок спеціалізованих і неспеціалізованих клітин, як і спіральність, може залежати від гравічутливості системи мікрофібрил целюлози, адже така форма у симетрії клітин, органів властива для багатьох рослин. Чи може хвилястість модифікувати положення клітинних рядів і кут нахилу клітин та бути передумовою кругових рухів кореня.

У розділі 7 “Розподіл ауксину в коренях, сформованих *de novo* на листових експлантах” проаналізовано розподіл ауксин-залежного репортерного білка DR5rev::GFP в коренях *A. thaliana*, утворених з насіння та в культурі *in vitro* при гравістимуляції і кліноостатуванні. Встановлено, що ауксин розподіляється подібним чином в контролі та експериментальних умовах, тобто корені *in vitro* відчують та можуть сприймати гравітаційний стимул. Кліноостатування, яке моделює відсутність гравітаційного вектора в космосі, гальмує гравітропну реакцію кореня та полярний транспорт ауксину, що підтверджує його придатність для відтворення біологічних ефектів реальної мікрогравітації в космічному польоті.

На рис. 7.1 (стр. 120) інтенсивність люмінесценції рослин з насіння і у культурі відрізняються, чи це просто візуальний ефект? На мою думку, обговорення отриманих дисертантом результатів недостатнє, тому чи доречно було робити окремий розділ 7.

Висновки складаються з 9 пунктів, у повному обсязі розкривають сутність результатів роботи та відповідають завданням, поставленим дисертантом для реалізації мети оригінальних досліджень. Загалом є коректними, логічними і достатньо повними.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертантом уперше обґрунтовано, що модель ризогенезу *in vitro* з листових експлантів *A. thaliana* є найбільш придатною для наземних дослідів та космічних експериментів. Показано, що структурно-функціональна організація, диференція клітин кореневого чохла та ростових зон власне коренів з листових експлантів дикого типу і *scg* мутанта *in vitro* за умов модельованої мікрогравітації аналогічна як у зародкових коренів проростків.

Встановлено подібність ступеня гравічутливості клітин, неспеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу та гравірецепторних клітин чохла коренів, утворених *de novo*. Визначено локалізацію ауксин-залежного репортерного білка в трансгенних рослинах *A. thaliana* DR5rev::GFP.

Підтверджено придатність кліноостатування для відтворення біологічних ефектів реальної мікрогравітації в космічному польоті, оскільки *in vitro* зберігається здатність до повної реалізації генетичної програми індукції ризогенезу та росту коренів.

Практичне значення одержаних результатів

Створено основу для дослідження адаптації рослин до умов реальної та модельованої мікрогравітації, з'ясування природи гравічутливості і гравізалезності клітинних процесів та розробки технологій вирощування рослин в космосі з метою життєзабезпечення.

Достовірність результатів, положень і висновків підтверджується комплексним підходом дисертанта до вирішення завдань, зокрема дослідження культури тканин *in vitro* дикого типу, *scr* мутанта і трьох ліній трансгенних рослин *A. thaliana in vitro*, а саме в калусній культурі й на листових експлантах в стаціонарному контролі та під впливом горизонтального повільного кліностакування та гравістимуляції із застосуванням методів світлової, електронної та конфокальної мікроскопії. Основні результати та положення роботи опубліковані в 16 наукових працях, з яких 4 статті у провідних фахових виданнях, 1 стаття в зарубіжному науковому виданні та 11 тез доповідей. У дисертації та авторефераті наводяться публікації дисертанта.

Робота читається легко, написана на належному науковому рівні, проте допущено забагато описок, трапляються і некоректні стилістичні вислови. Деякі рисунки у дисертації недоопрацьовані, тому не завжди вдало ілюструють та обґрунтовують отримані результати. Дані аналізів наведені лише у таблицях, графіки відсутні.

Оцінка обґрунтованості і достовірності наукових положень та висновків

Рецензована робота І.В. Булавина є результатом всебічного аналізу впливу мікрогравітації на морфогенез та диференціацію клітин рослин *A. thaliana*, індукції ризогенезу *in vitro*, а також встановлення структурно-функціональної організації та гравічутливості коренів. Всі розділи дисертації ґрунтуються на великому обсязі фактичного матеріалу експериментальних досліджень, отриманих автором самостійно. Наукові коментарі підкріплюються ілюстраціями (рисунками, таблицями). Результати досліджень мають теоретичне, методичне та практичне значення для сучасної клітинної біології, цитології, гістології рослин, а також для космічної біології.

Наукові положення та висновки, викладені в дисертації, достатньо обґрунтовані, підтверджуються опрацюванням праць вітчизняних і зарубіжних авторів з даної проблематики; умілим поєднанням сучасного дослідницького інструментарію і класичних методів дослідження тощо.

Основні результати дисертації достатньо апробовані на міжнародних конференціях (Україна, Росія, Італія, Казахстан), обсяг друкованих робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук. Зміст автореферату є ідентичним до змісту дисертації і достатньо повно відображає основні положення досліджень.

Матеріали дисертації і автореферату викладено логічно і послідовно. Робота є самостійною, завершеною, цілісною. За обсягом, структурою та оформленням і автореферат, і дисертація відповідають чинним вимогам щодо

“Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань” до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Зауваження до дисертації І.В. Булавина стосуються переважно некоректних висловів, оформлення та деяких дискусійних питань. Вони не знижують високого рівня дисертації і не можуть суттєво вплинути на високу оцінку рецензованої праці.

Висновок офіційного опонента

Дисертація Булавина Іллі Володимировича виконана на високому науковому та методичному рівні, є завершеним, самостійним дослідженням, у котрому отримані нові наукові факти та результати, які сприятимуть розвитку космічної біології, зокрема експериментів щодо впливу умов реальної мікрогравітації на ризогенез.

Основні положення та висновки роботи обґрунтовані, мають вагомим теоретичне і практичне значення, автореферат і публікації об’єктивно відображають зміст дисертації. Дисертант виконав значний об’єм роботи, використовуючи найновіші методи та методичні прийоми, всебічно проаналізував гравізаляжність процесів ризогенезу.

Робота Булавина І.В. вирізняється високим науковим рівнем, є піонерною щодо комплексного вивчення моделі ризогенезу із листкових експлантів *in vitro*, яка пропонується для використання в космічних експериментах, ґрунтується на власних дослідженнях автора і заслуговує високої оцінки.

Отже, дисертація “Особливості морфогенезу коренів *Arabidopsis thaliana* (L.) Neunh. в культурі *in vitro* в умовах кліностатування” є вагомим внеском у розвиток сучасної космічної біології. На цій підставі вважаю, що робота відповідає вимогам до кандидатських дисертацій ДАК МОН України, а її автор Булавин Ілля Володимирович заслуговує на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю цитологія, клітинна біологія, гістологія – 03.00.11.

Офіційний опонент
зав. відділу екоморфогенезу рослин
Інституту екології Карпат НАН України, к.б.н.

Лобачевська О.В.

Підпис О.В. Лобачевської засвідчую
вчений секретар ІЕК НАН України, к.б.н.

Білонога В.М.

25 вересня 2017 р.

