

ВІДГУК

офіційного опонента

на дисертаційну роботу ФЕДЮК Ольги Миронівни

«СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ

**ХЛОРОПЛАСТІВ І МІТОХОНДРІЙ ЛИСТКІВ *GALANTHUS NIVALIS* L.
ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР»,**

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Незважаючи на підвищення середньорічної температури, що спостерігається в світі в останні десятиліття, для більшості країн Європи актуальність проблеми холодо- і морозостійкості рослин не тільки не знижується, а й зростає. Зокрема, в Україні останніми роками відзначається велика амплітуда температур в зимовий і весняний періоди від високих до низьких. Сніговий покрив рідко зберігається протягом всієї зими, що створює несприятливі умови для зимуючих рослин як культурних, так і дикорослих. Також кліматологи припускають небезпеку несподіваного глобального похолодання. Зважаючи на це, дослідження механізмів адаптації рослин до екстремальних низьких температур є важливим науковим і практичним завданням. Дисертаційна робота О.М. Федюк репрезентує саме таку тематику. Автором вдало обрано як модельний об'єкт один з видів дикорослих ефемероїдів – підсніжник білосніжний (*Galanthus nivalis* L.). В ході еволюції рослини цього виду адаптувалися до впливу низьких температур завдяки унікальним видоспецифічним механізмам. Власне, на з'ясування частини з них і спрямоване дисертаційне дослідження О.М. Федюк, яке виконувалося в рамках тематики відділу мембранології та фітохімії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Оскільки успішність адаптації рослин до низьких температур значною мірою пов'язана з механізмами, що забезпечують процеси дихання та фотосинтез, автор зосередила увагу в першу чергу на дослідженні структури і функціонування мітохондрій і хлоропластів. Основна мета роботи полягала у виявленні структурних перебудов хлоропластів, мітохондрій та їх зв'язку з ефективним функціонуванням фотосинтетичного апарату в ході адаптації листків *G. nivalis* до низьких температур. Завдання роботи повністю відповідають меті. Вони, зокрема, полягали у виявленні зміни ультраструктури, інтенсивності загального та ціанід-резистентного дихання в клітинах мезофілу листків підсніжника на різних етапах весняного періоду та за гіпотермії; визначенні особливостей змін ультраструктури гран та фотохімічної активності хлоропластів листків; дослідженні впливу

екзогенної сахарози на ультраструктуру гран хлоропластів; з'ясуванні змін мікроструктури поверхні листків і продихів на різних етапах весняного розвитку та за дії низьких температур.

Дисертаційна робота написана українською мовою і викладена на 185 сторінках. Вона має структуру, що відповідає чинним вимогам, і складається зі вступу, огляду літератури, опису об'єктів і методів досліджень, чотирьох експериментальних розділів, узагальнення результатів, списку використаних джерел, висновків та двох додатків.

У перших двох підрозділах огляду літератури проаналізовано сучасні відомості про структурні і функціональні особливості мітохондрій і хлоропластів. Підрозділ 1.3 присвячений впливу низьких температур на структуру та функціонування мітохондрій і хлоропластів. Важливо, що у ньому автор описує ряд унікальних адаптивних механізмів, характерних для рослин, що походять з Арктики і Антарктиди. У наступному підрозділі автор детально аналізує такі функціонально пов'язані складові адаптації до гіпотермії, як термогенез і ціанід-резистентне дихання. Зокрема, увагу зосереджено на дискусії стосовно функцій альтернативної оксидази у термогенних і нетермогенних рослин. Також наведено сучасні дані про участь кріопротекторів (сахарози, проліну та ін.) в адаптації рослин до гіпотермії. Наприкінці огляду автор робить акценти на конкретних питаннях, що залишаються майже нез'ясованими. Це, зокрема, особливості перебудови фотосинтетичного апарату і мітохондрій та їх функціонування у ефемероїдних видів рослин на різних етапах росту листків за низьких температур, участь сахарози в реакціях фотосинтетичного апарату на вплив низьких температур. Огляд літератури базується на актуальних сучасних джерелах, переважна більшість яких англомовні.

У розділі 2 описано матеріал та методи дослідження. Дисертант наголошує, що вибір експериментального об'єкта був зумовлений здатністю фотосинтетичного апарату листків *Galanthus nivalis* формуватися і функціонувати протягом весни за низьких температур. У підрозділі 2.1 наводиться детальна ботанічна характеристика цього виду. Важливо, що частина досліджень проводилася з інтактними рослинами без вилучення їх з ґрунту. У підрозділі 2.2 описана методика загартування рослин та дослідження впливу екзогенної сахарози на структуру і функціонування хлоропластів. У наступних підрозділах детально описані методики досліджень з використанням трансмісійної і сканувальної електронної мікроскопії, а також світлової мікроскопії. Навіть сам по собі спектр методів, що використовувалися, свідчить про високий методичний рівень роботи.

Вимірювання показників температури атмосферного повітря, ґрунту і листків *G. nivalis*, здійснювали методом інфрачервоної термографії, який було адаптовано відповідно до характеру досліджень (підрозділ 2.7). Для дослідження функціонування мітохондрій і хлоропластів було використано методи полярографії (підрозділ 2.8) та флуоресценції хлорофілу (підрозділ 2.9), які описано з необхідним ступенем деталізації. У розділі також наведено відомості про повторення спостережень/експериментів та методи статистичної обробки результатів.

У розділі 3 (першому експериментальному) охарактеризовано морфологію, анатомію та мікроструктуру поверхні листків *G. nivalis* за умов гіпотермії. За даними автора, головною ознакою поверхні листків *G. nivalis* є добре розвинена кутикула і наявність товстого шару епікутикулярного воску. Продихи розташовані на обох сторонах листків нижче від рівня епідерми. Ширина та довжина продихів, їх площа і розміри щілини відрізнялися стабільністю.

У розділі 4 наведено дані про структурні зміни мітохондрій мезофілу листків *G. nivalis*, а також зміни інтенсивності загального і ціанід-резистентного дихання на різних етапах весняного розвитку ефемероїда.

Автор відзначає, що помітне збільшення площі крист і видовження форми мітохондрій на зрізах на вегетативному етапі розвитку пов'язане з їх високою функціональною активністю і може розглядатися як адаптивна реакція ефемероїда на вплив низьких температур. Водночас подальше зменшення розмірів площі зрізу крист та мітохондрій під час бутонізації і цвітіння *G. nivalis* очевидно пов'язане зі зменшенням впливу низьких температур повітря і відповідно відсутністю потреби у високій інтенсивності метаболічних процесів в клітинах листків.

Отримані дані про морфологію мітохондрій листків *G. nivalis* свідчать про високий рівень варіабельності різних параметрів, що, на думку автора, можна розглядати як адаптивну стратегію, спрямовану на збереження листків в ранньовесняний період за низької температури та високого рівня сонячної радіації. Автором чітко виявлено ефект термогенезу на окремих фазах розвитку рослин. Також показано, що від'ємна температура на вегетативному етапі спричиняла зростання частки ціанід-резистентного дихання. В цілому інтенсивність альтернативного дихання перебувала у зворотній залежності від температури атмосферного повітря.

У першому підрозділі розділу 5 описано ультраструктурні зміни хлоропластів на різних етапах розвитку *G. nivalis*. Зокрема, відзначено наявність невисоких гран, незначне набрякання тилакоїдів, відсутність крохмальних зерен у хлоропластах протягом етапу появи листків з ґрунту. Ці

особливості, на думку дисертанта, можна вважати такими, що пов'язані з впливом на рослини низьких температур повітря. Автор припускає, що виявлені ультраструктурні зміни хлоропластів у *G. nivalis* відіграють важливу роль в універсальній стратегії адаптації фотосинтетичного апарату до впливу низьких температур і це припущення підтверджується результатами, наведеними у наступному підрозділі 5.2. Застосування методу флуоресценції хлорофілу у адаптованих до темряви листків при активації фотосинтезу різною інтенсивністю світла дало змогу оцінити функціональний стан фотосистеми II у листках *G. nivalis*. Автором зроблено висновок, що протягом весняного періоду під час появи листків та на вегетативному етапі розвитку *G. nivalis*, навіть за низьких температур атмосферного повітря, фотосинтетичний апарат вже був сформованим, залишався непошкодженим і активним, що підтверджується значеннями показника Φ_{PSII} . Виявлена повна відсутність крохмалю в хлоропластах листків *G. nivalis* стала підставою для припущення, що в стабілізації структури та функціонування фотосинтетичного апарату за низьких температур можуть брати участь цукри. Це до певної міри підтверджено шляхом дослідження впливу екзогенної сахарози на структурно-функціональні особливості хлоропластів мезофілу, результати якого викладені у розділі 6.

У цьому розділі, зокрема, показано, що після охолодження листків до температури -5°C у хлоропластах контрольних рослин виявлявся різкий набряк гран, а у листків, оброблених розчином сахарози, набряки були значно меншими. Обробка сахарозою спричиняла збільшення кількості тилакоїдів на грану, при цьому довжина і товщина тилакоїдів гран зменшувалася. Також показаний зв'язок між ультраструктурними змінами хлоропластів та змінами фотохімічної активності фотосинтетичного апарату. Так, встановлено значне розширення меж оптимальних температур для функціонування фотосинтетичного апарату у листків, які обробляли 0,1 М сахарозою. Зокрема, за екстремальної температури -15°C коефіцієнти фотохімічного і нефотохімічного гасіння становили $qP=0,69$ і $qN=0,15$ проти $qP=0,15$ і $qN=0,60$ у відповідному контролі.

Наприкінці тексту дисертації наведено узагальнення. Згідно з ним ключовими особливостями, що зумовлюють стійкість *G. nivalis* до впливу низьких температур, є надійний захист поверхні листків, який забезпечується товстим шаром кутикули та екстракутикулярного воску, малою щільністю порохів та перебуванням на етапі проростання значної їх частини закритими. Іншими клітинними механізмами адаптації підсніжника є зміни ультраструктури мітохондрій і хлоропластів, поєднані зі змінами їх

функціонування. Зокрема, показано зростання частки альтернативного дихання за низьких температур. Водночас дослідження показників фотосинтетичної активності показали, що за дії низьких температур в хлоропластах забезпечувався високий рівень ефективного квантового виходу фотохімічного перетворення енергії. Це, на думку автора, пов'язано з особливостями структури тилакоїдів і гран хлоропластів, що запобігають руйнуванню фотосистеми II.

Безперечною перевагою роботи є дуже вдало вибраний модельний експериментальний об'єкт. Як справедливо відзначає дисертант, рослини виду *G. nivalis*, які одними з перших на території України з'являються на поверхні ґрунту навіть з під шару снігу і переходять до цвітіння наприкінці лютого або на початку березня, по праву можуть вважатися еталоном екологічної стійкості. Автор розглядає цей модельний об'єкт як перспективний і для вивчення механізмів адаптації рослин до інших несприятливих абіотичних чинників, зокрема, низької вологості і високої освітленості.

На прикладі *G. nivalis* дисертантом вперше виявлено кількісні та якісні адаптивні зміни мітохондрій мезофілу листків, функціонально пов'язані з активацією ціанід-резистентного шляху дихання. Встановлено, що кількісні зміни в ультраструктурі хлоропластів клітин мезофілу листків у весняний період забезпечують ефективне функціонування фотосинтетичного апарату за низьких температур. Показано, що сахароза здатна запобігати руйнуванню та фотоінгібуванню фотосинтетичного апарату за від'ємних температур. Важливим також є новий підхід до фіксації ефекту термогенезу безпосередньо в природних умовах. Автором створений пристрій для моніторингу температури листків рослин, захищений патентом на корисну модель (№ 117136 в державному реєстрі патентів України на корисні моделі 12.06.2017 р.).

У роботі є окремі недоліки:

1. Незрозуміло, як у *Deschampsia antarctica* високий відсоток насичених жирних кислот у клітинних мембранах листків поєднується з стійкістю до гіпотермії (огляд літератури, с. 47).
2. Не пояснюються конкретні механізми впливу екзогенної сахарози на ультраструктуру хлоропластів. Зокрема, незрозуміло, яким чином обробка 0,1 М розчином сахарози може збільшити кількість тилакоїдів на грану вдвічі порівняно з контролем (с. 130).
3. В цілому дисертація добре ілюстрована фотографіями і графіками, проте в узагальненні відсутні будь-які схеми, які б могли наочно

показати ієрархію досліджуваних у роботі механізмів адаптації *G. nivalis* до низьких температур.

Вказані недоліки жодним чином не зменшують наукової цінності роботи. Дисертаційне дослідження О.М. Федюк є самостійною завершеною цілісною науковою роботою з достатнім ступенем новизни і практичного значення. Достовірність результатів підтверджена коректним використанням методів статистичної обробки. Автореферат дисертації відображає її основний зміст. Результати опубліковані у 16 наукових працях, у т.ч. 7 статтях у фахових виданнях (серед яких дві статті – у журналах з переліку Scopus), робота пройшла широку апробацію на міжнародних наукових конференціях, у тому числі в країнах Євросоюзу.

Таким чином, дисертаційна робота ФЕДЮК Ольги Миронівни за актуальністю, обсягом і змістом відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів і вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України 23.07.2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.


Офіційний опонент

доктор біол. наук, професор,
зав. кафедри ботаніки і фізіології рослин
Харківського національного аграрного
університету ім. В.В. Докучаєва



Ю.Є. Колупаєв



Підпис  засвідчується
Керівник відділу діловодства і канцелярії

Г. Маршала
20 20 р.