

Відзив

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Козеко Людмили Євгенівни** «Роль молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Актуальність теми дисертації. Рослини як прикріплені організми постійно підпадають дії мінливих факторів середовища. Для того, щоб вижити та конкурувати, вони повинні інтерпретувати інформацію та адекватно відповідати на неї завдяки розширенню норми реакції або діапазону стійкості. Затоплення, посуха, температура та інші стресори призводять до порушення білкового гомеостазу. Підтримка білків в їх функціональних нативних конформаціях та запобігання агрегації ненативних білків є важливими для виживання клітини при стресі. Білки теплового шоку – HSP, що функціонують як молекулярні шаперони, є ключовими компонентами у захисті та відновленні протеостазу, підтриманні багатьох клітинних процесів, забезпеченні неспецифічної адаптації рослин. Для дослідження автором обрано родини HSP70 і HSP90, які функціонують у всьому діапазоні стійкості, необхідні для життєздатності рослин та відіграють важливу роль при стресі. Однак, недостатньо вивченими залишаються особливості функціонування окремих членів цих родин як за нормальних, так і за критичних умов середовища. Одним з перспективних напрямів є визначення взаємозв'язку динаміки синтезу HSP з адаптивними властивостями видів. Значна увага приділяється з'ясуванню їх ролі у забезпеченні стабільності та пластичності, індукції експресії при дії різноманітних стресів. Однак питання впливу HSP70 та HSP90 на формування фенотипу рослин, його пластичність і, одночасно, гомеостаз, досі ще залишається далеко нез'ясованими. Отже, комплексне дослідження різних напрямів функціонування білків HSP70 і HSP90 у забезпеченні меж і шляхів формування фенотипу рослин, їх ролі у стабільності та пластичності розвитку у видів з різним адаптаційним потенціалом, а також за змін зовнішніх факторів різної природи є, безсумнівно, актуальним. Вирішення цих питань сприятиме суттєвому доповненню та поглибленню існуючих уявлень щодо особливостей функціонування системи шаперонів у забезпеченні онтогенезу рослин.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами. Дисертаційна робота виконувалась у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту

ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за держбюджетними темами: «Стабільність та пластичність морфогенезу рослин та клітинної організації при змінах водного режиму в природних умовах» (№ ДР 0106U000558, 2006-2009 рр.), «Фенотипічна та генетична пластичність в процесі адаптації рослин до змін навколишнього середовища» (№ ДР 0107U000515, 2007-2011 рр.), «Розробка та підготовка до впровадження методу оцінки стану рослин у несприятливих умовах зовнішнього середовища» (№ ДР 0110U004030, 2010 р.), «Пластичність онтогенезу рослин при змінах водного режиму екотопів: клітинні та молекулярні аспекти» (№ ДР 0110U000087, 2010-2014 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті» (№ ДР 0112U000059, 2012-2016 рр.), за держконтрактом з НКАУ «Проведення фундаментальних і прикладних досліджень з космічної біології, медицини та біотехнології» (№ ДР 0208U005235, 2001-2007 рр.), «Проведення перспективних наукових досліджень з клітинної біології та мікрогравітації» (№ ДР 0108U009552, 2008-2012 рр.), «Роль шаперонів Hsp90 у прояві генетичних порушень, генерованих космічним середовищем (екзобіологічний експеримент з насінням *Arabidopsis thaliana*)» (№ ДР 0112U004174, 2012 р.) та підчас стажування у Центрі молекулярної біології рослин університету м. Тюбінген (Німеччина, 2018 р.).

Новизна дослідження та одержаних результатів.

На широкому експериментальному матеріалі показано, що підтримання протеостазу за зміни умов середовища відбувається шляхом якісних і кількісних змін клітинного пулу шаперонів з його збільшенням при наближенні до меж діапазону стійкості організму. Визначено специфічні для членів мультигенних родин *AtHSP70* і *AtHSP90* рівні конститутивної експресії та динаміку індукції у відповідь на підвищення температури і водний дефіцит. Виявлено тканинну специфічність експресії окремих *AtHSP70* і *AtHSP90*. Доведено, що індукцйбельні члени цих родин є важливим інструментом у забезпеченні стійкості – з провідною роллю HSP70. На прикладі індукованої та перехресної стійкості показано, що посилена експресія індукцйбельних генів супроводжується розширенням діапазону стійкості організму. Вперше визначено, що імуноспоріднені цитозольні HSP70 у рослин різних таксонів характеризуються видовими особливостями кінетики синтезу за критичних змін екологічних факторів, тісно пов'язаними з процесами метаболічної, фізіологічної і структурної адаптації. Показано участь цитозольних HSP70 і

HSP90 у стрес-реакції і адаптації клітин за дії гіпергравітації та симульованої мікрогравітації (кліностакування). Вперше визначено, що кліностакування призводить до виникнення перехресної стійкості до високої температури завдяки посиленню здатності клітин до стресової індукції генів цитозольних HSP70 і HSP90. Розроблено метод оцінки стану рослин з використанням HSP70 як біомаркера.

Отримано докази існування у рослинних клітин механізму регуляції синтезу HSP та стійкості цитозольними HSP90. Підтверджено існування негативної регуляції експресії генів HSP шаперонами HSP90 в рослинних клітинах. Встановлено, що обробка насіння інгібітором HSP90 впливає на стійкість, ріст і розвиток рослин.

Показано значення загальної активності клітинного пулу HSP90 для стабілізації росту, розвитку і нормального формотворення при мікрофлуктуаціях внутрішнього і зовнішнього середовища, а також за дії гено- і протеотоксичних факторів. Отримано нові дані для HSP90 і вперше встановлено для HSP70, що функціонування окремих цитозольних ізоформ є важливим для стабілізації нормального формотворення і пластичних реакцій органів рослин за змін світла і гравітації.

В результаті теоретичного узагальнення експериментальних досліджень запропоновано модель взаємодії різних функцій шаперонів HSP90 та підтримки протеостазу в нормі та за умов стресу.

Практичне значення результатів досліджень. Результати роботи суттєво розширюють та узагальнюють існуючі уявлення щодо особливостей функціонування шаперонів у рослин. Результати можуть бути використані в навчальних курсах з біохімії, молекулярної біології, клітинної біології та фізіології рослин в контексті механізмів стресової реакції та адаптації рослин до змін умов довкілля, молекулярних основ пластичності та стабільності онтогенезу.

Розроблено метод визначення стану рослин природних фітоценозів та інтродукованих рослин, що включає оцінку фізіологічного стану рослини та оцінку впливу на неї екологічних факторів шляхом визначення вмісту HSP70 за допомогою імунодетекції.

Отримані результати закладають основи для подальшої розробки технології управління стійкістю рослин. Запропоновано обробку інгібіторами HSP90 насіння, що підвищує ефективність використання світлочутливих високовартісних антибіотиків, порівняно з їх внесенням в середовище

виращування або обробкою рослин. Інкубація насіння з інгібіторами HSP90 після дії іонізуючої радіації може бути рекомендована для виявлення на рівні фенотипу залежних від шаперона генетичних змін і відбраковування дефектних організмів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертантом одержано великий обсяг оригінального експериментального матеріалу, який детально та послідовно викладається в кожному з трьох розділів експериментальних досліджень (4-6 розділи). В 7 розділі проведено аналіз та узагальнення матеріалу. Автором опрацьована та професійно використана значна кількість літературних джерел (491 найменувань). Обсяг основного тексту дисертації становить 347 сторінок. Отримані дані проілюстровані 118 рисунками та графіками, 23 таблицями та супроводжуються додатками (А-Е з таблицями). Треба зазначити, що автором проведена велика, кропітка, дуже скрупульозна робота по обробці величезного фактичного матеріалу, із застосуванням різних видів графічного оформлення та статистичного аналізу. Достовірність результатів забезпечено широким спектром сучасних методів: цитологічних, цитохімічних, морфометричних, феномного аналізу, молекулярно-біологічних, генетичних, фізіологічних та статистичної обробкою експериментальних даних. Дисертацію написано гарною мовою, логічно, послідовно і переконливо. Висновки відповідають отриманим експериментальним даним. Автореферат відображує зміст дисертації.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. За матеріалами дисертації опубліковано 74 наукові роботи, у тому числі 26 статей (22 у фахових виданнях), 1 патент України на корисну модель, 47 тез в матеріалах всеукраїнських і міжнародних конференцій та з'їздів. Матеріали дисертаційної роботи пройшли широку апробацію – представлені на 37 всеукраїнських і міжнародних наукових форумах.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є оригінальним самостійним завершеним дослідженням, виконаним на підставі власних теоретичних і практичних напрацювань. Основна частина результатів експериментальних досліджень, представлених у дисертації, отримана автором особисто. До дисертації включено дані експериментів, проведених разом з науковими співробітниками відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Права співавторів не порушено. Більшість

статей було підготовлено автором особисто. В цілому, у проведенні досліджень, їх аналізі та узагальненні частка автора складає близько 85%.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

При високій позитивній оцінці роботи та її вкладу в науку у мене є ряд запитань та зауважень загального та спеціального характеру:

1. Стосовно мікрогравітації як «незнайомого» стресового фактору та відсутності у рослин програми генетично детермінованої відповіді на мікрогравітацію (С.18, 21, 59, автореферат, с. 100, 221-224 та ін., дисертація).

- На мою думку, це не зовсім так. І ось чому. По-перше, відомо, що предки сучасних наземних рослин формувались та еволюціонували ще в океані. Тому, формування адаптації до мікрогравітації, ймовірно, відбувалося у водному середовищі, фактично, за умов мікрогравітації. По-друге, як показано і сказано авторкою, в реакції клітин на мікрогравітацію беруть участь дуже консервативні системи шаперонів, які є як у всіх еукаріот, так і прокаріот, тобто мають довгий еволюційний шлях. По-третє, відносно програми відповіді на мікрогравітацію, можна процитувати відому роботу Т. Носон, 2014 (Plant growth and morphogenesis under different gravity conditions...) «...в умовах мікрогравітації рослини, звільняючись від обмеження сили тяжіння та демонструють т.з. автоморфогенез, одним з проявів якого є стимуляція росту та анізотропний характер росту... Такий ріст, наприклад, спостерігається у деяких водних рослин.» Отже, мікрогравітацію не можна вважати повністю «незнайомими» умовами, на які у наземних рослин не існує відповіді. Тому і висновок (с. 68-69) про те, що рослини здатні адаптуватися до відсутності гравітації, причому, адаптація здійснюється в межах фізіологічної відповіді (Kordyum, 1997), є цілком логічним.

2. При феномному аналізі нокаут-мутантів *Athsp90-1*, *Athsp90-4*, *Athsp70-5* автором не враховувалися наслідки генетичної нестабільності мутантів (С.317). Думаю, що посилення варіабельності темпів розвитку може бути пов'язано не тільки з мутацією конкретних *Athsp90-1* або *Athsp70*, а також з порушенням генетичного гомеостазу або генетичною нестабільністю мутантів в цілому. Тому, в якості додаткового контролю бажано було б порівняти розвиток інших нокаут-мутантів або навести приклади з літератури щодо таких випадків.

3. Відносно оцінки стану рослин при переході до цвітіння: «...обробка насіння ГДА призводила до зниження кореляційного зв'язку між кількістю листків розетки і часом переходу до генеративного розвитку, що вказує на

послаблення взаємозв'язку через зниження стабільності темпів формування листків після обробки ГДА». (С.279).

- Дійсно, формування вегетативної маси у рослин зазвичай корелює з переходом до генеративного етапу онтогенезу, але, нажаль, в дисертації немає ніякої інформації стосовно кореневої системи, розвиток якої теж суттєво впливає на перехід рослин до цвітіння.

4. Відносно думки автора щодо гетерогенності насіння арабідопсису з природних популяцій: «...насіння, зібране з рослин п'яти природних популяцій, є гетерогенним за якістю внаслідок варіабельних умов середовища під час його формування і дозрівання, а також низького рівня гетерозиготності...» (С.26, 280).

- Гетерогенність насіння природних популяцій, на мою думку, може бути наслідком спонтанного мутагенезу та гетерогенного походження вихідних форм популяцій. Арабідопсис як самозапилювач є гомозиготним організмом, тож низький рівень гетерозиготності не може підвищувати гетерогенність насіння.

5. Автор пише: «...фенотипічні аномалії часто з'являються або корегуються на рівні окремого модуля...» (С.28). ...логічно припустити, що вплив HSP90 і HSP70 на визначення морфогенетичної програми може відбуватися дискретно на рівні окремого модуля» (С.307).

- Мабуть йдеться не про дискретність впливу шаперонів, а про дискретність онтогенезу, в тому числі, процесу закладки листових примордіїв в апексі та ін.

6. Пошукачка пише, що збереження верхівкових листків і точки росту після теплової експозиції дослідних рослин (*M. silvestris* і *M. Pulchella*)... відбувалось за рахунок відмирання нижніх листків...». (С.196, 4 розділ). Хотілося б почути, як пов'язані ці процеси.

7. Хоча дисертація добре вичитана, в її тексті зрідка, але зустрічаються технічні помилки та невдалі вислови. Так, на с. 274 та ін...: «ненормальні процеси, ненормальні розміри, ненормальна кількість листків...».

- краще було б вживати – «аномальні або незвичайні». Відносно терміну «фенотипічна» пластичність, мабуть, коректніше було б писати «фенотипова пластичність».

Але наведені зауваження не мають принципового значення, більшістю є технічними, тому ніяк не знижують наукової цінності роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являються до наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Дисертаційна робота **Козеко Людмили Євгенівни «Роль молекулярних шаперонів у фенотипічній пластичності рослин»** є завершеним оригінальним дослідженням, яке професійно виконано в кращих традиціях наукової школи відділу клітинної біології та анатомії та, в цілому, кращих наукових традиціях Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, з використанням широкого арсеналу сучасних методів та підходів, всебічним та глибоким аналізом літературних джерел та результатів власних досліджень. Робота характеризується новизною ідей та результатів, має вагомим теоретичне та практичне значення. За обсягом експериментального матеріалу, науково-теоретичною цінністю основних положень і висновків дисертація **Козеко Людмили Євгенівни** відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її авторка заслуговує на присудження їй на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Провідний науковий співробітник
відділу геноміки та молекулярної
біотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки» НАН України, д.б.н., с.н.с.

О.А. Кравець

12 червня 2019 р.

Григорис д.б.н., с.н.с. О.А. Кравець засвідчують.
Григорис секретар д.б.н., с.н.с. Г.В. Тірко
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України»

