

## **Відзив**

офіційного опонента на дисертаційну роботу

**Шевченко Галини Валеріївни «Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії»**, представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

### **Актуальність обраної теми дисертаційного дослідження**

Цитоскелет з його динамічними характеристиками, функціональною активністю, біохімічними властивостями є одним з інтегральних гравісенсорів клітини. Компоненти цитоскелету, разом із асоційованими білками, задіяні в підтримці структурної полярності, компартменталізації, субклітинної рухливості органел та везикул, трансляції сигналів між ядром і плазмалемою та клітинною стінкою та ін. Завдяки взаємодії цитоскелету із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою формується континуум, функція якого полягає у забезпеченні сприйняття та формуванні відповіді на дію біотичних та абіотичних факторів. Незважаючи на значний прогрес у дослідженні рослинного цитоскелету, залишаються нез'ясованими численні питання стосовно його організації та регуляції. Особливо гостро подібні питання висвітлюються під час аномальних умов, які супроводжують космічні польоти. Широко досліджується організація та динаміка елементів цитоскелету в полі зміненої сили тяжіння; виявлено зміни організації мережі цитоскелету та його транскриптому, які пов'язують саме із адаптацією рослин до мікрогравітації. Проте, багато питань впливу мікрогравітації на цитоскелет залишаються дискусійними, і, насамперед, це стосується функціонування асоційованих із МТ та АФ білків, які регулюють структурну та функціональну взаємодію елементів між собою і з цитоплазматичною мембраною. Мало відомостей про файли генної експресії, пов'язаної із реорганізацією елементів цитоскелету в умовах мікрогравітації. Розуміння ролі цитоскелету у пристосуванні рослин до умов зміненої сили тяжіння актуальне для створення біорегенеративних систем життєзабезпечення космонавтів у довгострокових космічних місіях, обов'язковим компонентом яких є рослини. Водночас, слід зазначити, що в умовах космічного польоту відбувається зміна конвекції повітря, що призводить до клітинної гіпоксії, яка негативно впливатиме на ріст та розвиток рослин. Розуміння реакції цитоскелету на вплив гіпоксії в умовах космосу вимагає знання особливостей його організації у рослин, які зазнають впливу гіпоксії у природних умовах. Відомо, що у відповідь на нестачу кисню у корі коренів рослин, онтогенез яких проходить частково у воді, формується специфічна аеренхіма, яка

покращує газообмін між стеблом та коренем. Раніше було встановлено, що цитоскелет активно залучено у формування аеренхіми, проте, залишаються невирішеними питання стосовно участі актинових філаментів та мікротрубочок у формуванні аеренхіми різних типів в природних умовах і за умов мікрогравітації. Відповіді на ці питання дають порівняльні дослідження організації цитоскелету у коренях повітряно-водних, а також, наземних рослин та рослин, вирощених в умовах кліноостатування. Саме тому, окреслені питання участі МТ та АФ у реакції клітин коренів на зміну сили тяжіння та гіпоксію складають актуальність дисертаційного дослідження, і формують мету і ключові завдання роботи.

### **Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими науковими програмами**

Дисертаційну роботу виконано у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Роботу виконано в межах держбюджетних тем: «Фенотипічна та генетична пластичність в процесі адаптації рослин до змін навколишнього середовища» (№ ДР0107U000515, 2006-2009 рр.), «Стабільність та пластичність морфогенезу рослин та клітинної організації при змінах водного режиму в природних умовах» (№ ДР0106U000558, 2006-2009 рр.), «Пластичність онтогенезу рослин при змінах водного режиму екотопів: клітинні та молекулярні аспекти» (№ ДР0110U000087, 2010-2014 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми адаптації рослин до несприятливих змін екологічних чинників (посуха, затоплення) в природі та експерименті» (№ ДР0112U000059, 2012-2016 рр.), «Дослідження біологічної дії мікрогравітації на мембранному та клітинному рівнях («Біолабораторія-М»), 2012 р).

Частина досліджень Шевченко Г.В. виконала під час наукових стажувань в Університеті міста Геттінген (Німеччина) та Університеті міста Аберистуїт (Велика Британія) за допомогою грантової підтримки програми з обміну науковими кадрами IRSES 612587 (2013-2017) (FP7, Maria Curie Actions).

### **Новизна дослідження та одержаних результатів**

Дисертантом всебічно проаналізована роль МТ та АФ у реакціях адаптації клітин коренів рослин до механічного стресу та гіпоксії. Встановлено, що при кліноостатуванні відбувається зниження рівня експресії генів *TUA6* та *CLASP* у коренях, що вказує на чутливість процесу полімеризації мікротрубочок та просторової організації їхньої кортикальної мережі до зміни механічного навантаження. Показана залежність між

деполімеризацією мікротрубочок та зниженням експресії генів *TUA6* та *CLASP*, а також між деполімеризацією мікрофіламентів та зниженням експресії генів *ACT2*, *MAP65-1*, *FH1* та *FH4*, яка свідчить про наявність регуляторного зв'язку між ними. Вперше виявлено, що експресія *MAP65-1* залежить від організації АФ. Встановлено, що кліностакування чинить механічний стрес на клітину, який полягає у знятті гравітаційного навантаження з її кортикальної області, що призводить до активації специфічного адаптаційного механізму, частиною якого є зміни у регуляції експресії генів *TUA6*, *CLASP*, *MAP65-1*, *FH1* та *FH4*. Вперше визначені особливості організації цитоскелету у клітинах кори ростових зон коренів *B. vulgaris* та повітряно-водних *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium*. Встановлені етапи участі цитоскелету у процесах формування (включаючи клітинну загибель) аеренхіми коренів в умовах гіпоксії. Показано, що дезорієнтація кортикального цитоскелету, а саме, МТ, є загальною реакцією клітин коренів рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію.

### **Практичне значення одержаних результатів**

Результати роботи суттєво розширюють уявлення про реакцію клітин коренів на такі типи абіотичного стресу як кліностакування та нестача кисню у середовищі, що є внеском у космічне рослинництво, оскільки дає підґрунтя для створення умов вирощування рослин під час довготривалих місій. Окрім того, дані щодо реакції цитоскелету на навколишні стимули, зокрема, дезорієнтування у просторі, є цінними для біотехнології сільськогосподарських культур, стійких до залягання та ламкості стебел під час буревіїв, що запобігає втраті врожаю. Дані роботи можуть бути використані у курсах з космічної біології рослин, клітинної та молекулярної біології у контексті механізмів реалізації стійкості рослин до стресу.

### **Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації**

Здобувачем одержано великий обсяг оригінального експериментального матеріалу, який детально та послідовно викладається в кожному з трьох розділів експериментальних досліджень. Окремим розділом виділений «Аналіз та узагальнення результатів досліджень», в якому підводиться підсумок проведеного дослідження та формулюються власні погляди на роль цитоскелету у адаптації рослин до стресу. Достовірність результатів забезпечено широким спектром сучасних методів дослідження, зокрема, методами клітинної біології – світлової, електронної та конфокальної мікроскопії, імуногістохімічними методами, методами прижиттєвого спостереження об'єктів за допомогою конфокальної

мікроскопії, а також молекулярно–генетичними методами (із використанням виділених зразків ДНК та РНК, полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (qPCR)), методами біохімічного визначення перекисного окиснення мембран, біоінформатичного аналізу з використанням спеціалізованих протеомних і геномних баз даних. Отримані дані репрезентативні і пройшли коректну статистичну обробку. Робота дуже добре проілюстрована якісними фотоматеріалами. Автором опрацьована значна кількість літературних джерел (537 найменувань). Обсяг основного тексту дисертації складає 296 сторінок друкованого тексту. Робота містить 14 таблиць, 75 рисунків та 3 додатки. Дисертація викладена логічно і послідовно. Висновки відповідають отриманим експериментальним даним.

### **Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та рефераті.**

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 53 наукових праці, з них 24 статті у фахових виданнях (включаючи Q1-Q3), 2 розділи у книгах та 27 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях. Реферат відображає зміст дисертації.

### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертація є завершеною науковою працею, виконаною на основі власних експериментальних розробок та теоретичних узагальнень. Дисертація є завершеною науковою працею, виконаною на основі власних експериментальних розробок та теоретичних узагальнень. Автором дисертаційної роботи самостійно сформульовано її концепцію та розроблено структуру, здійснений аналіз літературних джерел за тривалий період часу, окреслені експериментальні завдання, проведений аналіз експериментів, сформульовані узагальнення та висновки. Основна дослідна робота проведена дисертантом особисто. Інтерпретація та узагальнення частини результатів розділів 4–6 здійснювалися разом із співавторами публікацій. План дисертаційної роботи, вступ та висновки роботи обговорювалися із керівником відділу клітинної біології та анатомії, членом-кореспондентом НАН України, професором, д.б.н. Є.Л. Кордюм. Усі наукові узагальнення, висновки, теоретичні положення та припущення сформульовані автором особисто.

### **Дискусійні положення, запитання та зауваження щодо змісту дисертації**

При високій позитивній оцінці роботи, деякі положення потребують уточнень:



1. В узагальненні дисертації Галина Валеріївна, спираючись на роботи (Baluška et al., 1996; 2001, 2003, 2008), пише: «клітинам ДЗР притаманні унікальні сенсорні властивості..., які дозволяють апексу кореня ефективно моніторити навколишнє середовище і стабільно рости, завдяки чому ДЗР контролює ріст усього кореня».

- Однак, наступна фраза дещо протирічить вказаному: «Дані отримані для коренів *Arabidopsis* підтверджують той факт, що приріст кореня визначається швидкістю з якою апікальні райони кореня (тобто меристема - моє) постачають у ДЗР нові клітини (Beemster, Baskin, 2000).

Франтішек Балушка дійсно активно розвиває ідею щодо ДЗР як сенсорного і сенсорно-моторного центру керування в рослині. Однак, це лише гіпотеза. Хоча клітини ДЗР дійсно реагують на зміну певних біохімічних параметрів, водного режиму, тощо, треба з обережністю тлумачити інформацію про унікальні сенсорні властивості ДЗР. У рослин, як правило, сенсорне сприйняття і реакція на нього (тропізми) відбувається в різних зонах росту. Перехід до розтягнення у ДЗР пов'язаний, як відомо, з синтезом рецепторів до морфогенів, що надходять із чохла. До речі, Балушка відмічає, що основним сенсорним органом кореня є все ж таки чохлик і меристема.

- Ще один аргумент проти надчутливості ДЗР пов'язаний із збереженням властивості її клітин до розтягнення у випадку дії на рослину летальних доз опромінення. Тому, тлумачення про ДЗР як сенсорний центр, який ефективно моніторить навколишнє середовище, на мій погляд, є перебільшенням. Краще розглядати ДЗР як гнучку зону, клітини якої, знаходячись під жорстким контролем різноманітних ендогенних та/або екзогенних факторів, можуть повертатися до клітинного циклу, або виходити з нього, що забезпечує буферну здатність перехідної зони (Baluška et al., 2010a; Ivanov and Dubrovsky, 2013).

2. Гіпоксія, яку рослини зазнають у космічному кораблі і гіпоксія повітряно-водних рослин, – не однакові речі і тому це треба пояснювати. В останньому випадку, рослини потерпають як від нестачі кисню, так і  $\text{CO}_2$ . Тому, анатомія листків повітряно-водних рослин націлена і на ефективне поглинання  $\text{CO}_2$  (мас риси т.з. Кранц-анатомії).

3. В роботі іноді зустрічаються невдалі формулювання: «кліностатування не впливає на ступінь руйнування МТ таксоном і, водночас, доводить роль МТ у протидії стресу,... або свідчить про залучення кМТ у регулювання росту в умовах зміненої сили тяжіння».

Але наведені зауваження не мають принципового характеру і не знижують наукової цінності роботи.

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

Дисертаційна робота Шевченко Галини Валеріївни «Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії» є завершеною науковою працею. Актуальність обраної теми, застосування сучасних експериментальних методів та підходів, обґрунтованість наукових положень, висновків, сформульованих у дисертації, їх достовірність та наукова новизна, повнота викладу матеріалів в опублікованих працях свідчать про високий рівень представленої роботи, яка відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам пунктів 7–9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 1197 від 17 листопада 2021 року щодо докторських дисертацій, а її автор, Шевченко Галина Валеріївна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

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

 О.А. Кравець

1 березня 2024 р.

