

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Романчук Світлани Миколаївни
“Експресія гена β -глюкозидази та ультраструктура тілець
ендоплазматичного ретикулуму в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* під
впливом кліноостатування та іонізуючої радіації”, представлену на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 –
цитологія, клітинна біологія, гістологія

Актуальність теми роботи

Дисертаційна робота С. М. Романчук є оригінальним науковим дослідженням механізмів адаптації рослин до факторів космічного польоту, у якому вперше на клітинному і молекулярному рівнях проаналізовано участь гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ЕР-тілець та їхніх компонентів проростків коренів модельного об'єкту *Arabidopsis thaliana* на дію мікрогравітації та іонізуючого випромінювання.

Встановлено, що індукція гена *PYK10* і активація високо специфічного компонента ферменту ЕР-тілець β -глюкозидази під впливом мікрогравітації й Х-Опромінення може використовуватися як молекулярний маркер метаболічної адаптації рослин до умов вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення космонавтів у тривалих місіях у далекому космосі.

Виявлені закономірності відкривають нові підходи для вивчення та з'ясування механізмів толерантності рослин на клітинному та молекулярному рівнях до актуальних для космічного польоту доз іонізуючої радіації та є основою розробки технологій їх вирощування, зокрема овочевих культур родини Brassicaceae, що сприятиме поглибленню фундаментальних знань щодо гравічутливості процесів органогенезу рослин.

Тому тема дисертаційної роботи є актуальною, а доцільність таких досліджень є незаперечною, особливо у зв'язку з можливістю їх використання в наземних експериментах та умовах пілотованих космічних апаратів.

Офіційно дисертаційна робота виконувалася відповідно до 4-х 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 180 сторінках друкованого тексту з 13 таблицями, 37 рисунками і складається зі вступу, семи розділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який містить 303 найменування, та 2-х додатків.

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 встановити вплив повільного горизонтального кліноостатування та Х-Опромінення на структуру тілець ендоплазматичного ретикулуму (ЕР-тілець), експресію гена та функціональну активність β -глюкозидази в клітинах проростків кореня *A. thaliana*.

Для досягнення поставленої мети автором логічно сформульовано 4-і конкретні завдання. *Об'єктом дослідження* є лабільність і чутливість ЕР-тілець до абіотичних чинників. *Предмет дослідження* – структурні зміни ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла і клітинах дистальної зони розтягу власне кореня та участь ферменту β -глюкозидази у відповіді проростків *A. thaliana* на вплив кліноостатування та Х-Опромінення.

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

У літературному огляді, який містить 2 розділи (“Ріст та розвиток рослин під впливом реальної і модельованої мікрогравітації й іонізуючої радіації” і “Ендоплазматичний ретикулум, структура та функції”), висвітлено основні уявлення щодо структурно-функціональних змін рослин під впливом основних факторів космічного польоту – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Розглянуто особливості структури і функцій ендоплазматичного ретикулуму та похідних від нього ЕР-тілець. Охарактеризована участь специфічного компонента ЕР-тілець – β -глюкозидази, основна з яких кодується геном *РУК10*, у захисті рослин від впливу абіотичних і біотичних чинників. На основі аналітичного огляду джерел літератури обґрунтовано актуальність проведення досліджень щодо особливостей реакції гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ЕР-тілець та їх компоненту β -глюкозидази на вплив кліноостатування та Х-Опромінення *A. thaliana*, що є стійким до відносно «малих» та сублетальних доз іонізуючого випромінювання.

Розділ 3 “Матеріали та методи дослідження” характеризує методичні особливості отримання проростків коренів *A. thaliana*, використаних у дослідженнях впливу повільного горизонтального кліноостатування та Х-Опромінення; методи світлової, конфокальної та трансмісійної електронної мікроскопії; спектрофотометричного визначення загальної активності β -глюкозидази; ЗТ-ПЛР, ПЛР-ампліфікації ПЛР у режимі реального часу для аналізу на клітинному, біохімічному і молекулярному рівнях структурно-функціональної організації гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ЕР-тілець та їхніх компонентів проростків коренів модельного об'єкту *A. thaliana*.

У розділі 4 “Загальна морфолого-анатомічна характеристика проростків” наведено результати дослідження морфологічних ознак та анатомічної будови апексів коренів 3-, 5- та 7-добових етіолованих проростків *A. thaliana* в контролі та при обертанні на горизонтальному кліноостаті (2 об/хв). Для гострого Х-Опромінення проростків *A. thaliana* були обрані дози в діапазоні 0,5 Гр – 12 Гр, які до певної міри еквівалентні таким у кабіні космічного корабля.

Встановлено, що кліноостатування істотним чином не впливало на розміри та анатомічні ознаки апексів коренів, зокрема на гравірецепторні клітини центральної статевої осі. Виявлені дисертанткою незначні відмінності у ширині клітин ДЗР кореня (як найбільш чутливих до впливу зовнішніх чинників) в умовах кліноостатування суттєво не впливали на загальну будову коренів. Отримані дані підтвердили стійкість проростків *A. thaliana* до таких доз іонізуючого випромінювання на відміну з іншими видами рослин.

Розділ 5 “Ультраструктура клітин кореня” присвячений порівняльному аналізу змін в ультраструктурі ЕР-тілець клітин кореневого чохла та клітин дистальної зони розтягу власне кореня *A. thaliana*, сформованого у стаціонарних умовах та під час кліноостатування й іонізуючої радіації. Уперше встановлена участь ЕР-тілець в реакції на модельовану мікрогравітацію та іонізуючу радіацію – за рахунок більш активного утворення в клітинах, порівняно з нормою, збільшення гетерогенності їх форми і розмірів, як прояву адаптаційної реакції до дії абіотичного чинника, що забезпечує ріст рослин в цих умовах.

У розділі 6 “Активність β -глюкозидази” проаналізовано відмінності загальної активності β -глюкозидази: в 3-, 5- та 7-добових етіольованих проростках *A. thaliana* під впливом кліноостатування, що суттєво не змінювалася щодо контролю, тоді як за всіх застосованих дозах радіації (0,5 Гр – 12 Гр) ферментативна активність збільшувалася майже вдвічі через 2 год та дещо зменшувалася після 10 діб, проте мала схожий характер найвищої активації за дії мінімальної дози радіації 0,5 Гр та 8 Гр.

Важливо відзначити, що визначені незначні зміни активності β -глюкозидази як за дії відносно «малих», так і сублетальних доз радіації підтверджують стійкість проростків *A. thaliana* до доз 0,5 Гр – 12 Гр завдяки функціонуванню захисних механізмів клітини.

У розділі 7 “Експресія гена β -глюкозидази (*РУК10*)” вперше представлено результати дослідження експресії гена *РУК10*, який кодує основну β -глюкозидазу ЕР-тілець. Встановлено різну відповідь на ультраструктурному та молекулярному рівнях на дію стресового чинника. На відміну від кліноостатування, коли збільшення кількості та середньої площі зрізу ЕР-тілець на зрізі клітини кореня відбувається завдяки високій експресії гена *РУК10* та синтезу ферменту β -глюкозидази без збільшення його активності. Х-Опромінення спричиняло посилення як експресії гена *РУК10*, так і загальної активності β -глюкозидази без помітних порушень росту та морфології проростків. Посилення формування ЕР-тілець та активація експресії гена β -глюкозидази за впливу як кліноостатування, так і Х-Опромінення вказує на їх участь у захисній реакції клітин, що може використовуватись як молекулярний маркер впливу зовнішніх чинників різної природи.

Висновки складаються з 8 пунктів, у повному обсязі розкривають сутність результатів роботи та відповідають завданням, поставленим дисертантом для реалізації мети досліджень. Загалом є обґрунтованими, логічними і повними.

У додатку А представлено загальну характеристику ізоформ β -глюкозидази *A. thaliana*: ген, який їх кодує, сигнальна послідовність, наявність в ЕР-тільцях та основні функції.

Список 31 публікації за темою дисертації здобувача Романчук С.М. подано у додатку Б.

Наукова новизна отриманих результатів

Дисертантом уперше отримано нові докази участі ЕР-тілець як похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму в реакціях проростків *A. thaliana* на дію основних факторів космічного польоту – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Вставлено збільшення кількості та середньої площі ЕР-тілець на зріз клітини та мінливість їхньої форми і розмірів у статочитах, що переходить до секреції слизу, та клітинах епідерми дистальної зони розтягу кореня на вплив модельованої мікрогравітації (кліностакування) та іонізуючої радіації (Х-Опромінення). Вперше виявлено структурні зміни ГЕР та ЕР-тілець в клітинах кореневого чохла і клітинах епідерми ДЗР кореня при дії Х-Опромінення.

Вперше доведено, що кліностакування призводить до посилення в проростках експресії гена *РУК10*, що кодує β-глюкозидазу ЕР-тілець, проте не впливає на загальну активність ферменту. Х-Опромінення в діапазоні доз 0,5 Гр – 12 Гр, особливо в перші години після опромінення, спричиняє дозо-залежну активацію експресії гена *РУК10* та посилення загальної активності β-глюкозидази, що може використовуватись як молекулярний маркер впливу іонізуючої радіації.

Практичне значення одержаних результатів

Встановлені закономірності сприятимуть новим підходам для вивчення та з'ясування природи адаптаційних реакцій рослин на клітинному та молекулярному рівнях на вплив факторів, які діють в кабіні пілотованих космічних апаратів – мікрогравітації та іонізуючої радіації. Створено основу для тестування стійкості овочевих культур, насамперед представників родини Капустяних, до умов космічного польоту для вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення космонавтів у тривалих місях в далекому космосі.

Результати досліджень також можуть бути впроваджені у навчальний процес при підготовці спеціалістів із космічної біології, клітинної біології та екології рослин.

Достовірність результатів, положень і висновків підтверджується комплексним підходом дисертантки до дослідження участі ЕР-тілець, похідних гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, специфічним компонентом яких є фермент β-глюкозидаза, в клітинах кореневого чохла та в клітинах епідерми дистальної зони розтягу власне кореня проростків *A. thaliana* в адаптивних реакціях рослинних клітин та їх толерантності до дії модельованої мікрогравітації (повільного горизонтального кліностакування 2об/хв) та іонізуючої радіації (Х-Опромінення в дозах 0,5 Гр – 12 Гр). Особливості змін структурної та функціональної організації ЕР-тілець досліджено з використанням методів світлової, конфокальної та трансмісійної електронної мікроскопії, біохімії та молекулярної біології.

Основні результати та положення роботи опубліковано в 31 науковій праці, з яких 8 статей у фахових українських і зарубіжних виданнях та 23 тези

доповідей у матеріалах українських і міжнародних конференцій, симпозіумів та з'їздів. У дисертації та авторефераті наводяться публікації дисертанта.

Потрібно відзначити, що дисертаційне дослідження гарно оформлено, авторка вдало підтвердила отримані результати численними електронно-мікроскопічними рисунками, таблицями, графіками та схемами, що істотно підвищило їх інформативність. Особливо важливо, що дисертантка раз-у-раз зазначає нові перспективи для подальших досліджень.

Дискусійні положення та зауваження щодо дисертаційного дослідження.

До дисертації Романчук С. М. слід зробити такі зауваження, які мають здебільшого дискусійний характер, зокрема:

Робота читається легко, написана на належному науковому рівні, проте зрідка трапляються граматичні помилки та некоректні стилістичні вислови:

Треба “ядро набувало лопатевої форми”, а не лопатевої (стор. 78, 83, 95).

“В гіалоплазмі спостерігали велику кількість вільних рибосом, а також зустрічали полісоми та електрон-прозорі ділянки” (стор. 88). Треба : “...а також траплялися полісоми та електрон-прозорі ділянки”.

“З рисунку 6.4 видно, що загальна активність β -глюкозидази через 2 год після опромінення була вищою ніж через 10 діб після дії цього чинника” (стор. 106). Краще: “Результати, представлені на рисунку 6.4, свідчать, що загальна активність β -глюкозидази через 2 год після опромінення була вищою, ніж через 10 діб після його дії”.

“Як видно з рисунку 7.2, експресію гена *PYK10* детектували у всіх досліджуваних варіантах та відмічали її підвищення за всіх строків кліноостатування по відношенню до контролю” (стор. 112). Потрібно: “Отримані результати (рис. 7.2) вказують на те, що експресію гена *PYK10* детектували у всіх досліджуваних варіантах та відзначали її підвищення за всіх строків кліноостатування, порівняно з контролем”.

На мою думку, не зовсім вдала назва підрозділу 3.1.: “Рослинний матеріал та умови проведення експериментів”. Пропоную: “Умови отримання рослинного матеріалу та проведення експериментів”.

У розділі 4 нечітко представлені морфологічні ефекти 3-добових проростків коренів *A. thaliana* після збільшення дози X-Опромінення від 8 Гр до 12 Гр. Варто, було подати фотографії саме проростків коренів з асиметричними розетками листків, а не загальний вигляд культури в чашках.

Вважаю, що у 5 розділі або, принаймні, в узагальненнях результатів доцільно було б висловити детальніші міркування щодо значення збільшення середньої кількості та середньої площі ЕР-тілець на зрізі статоцита, що переходить до секреції, та клітини епідерми ДЗР, а також їх варіювання за розмірами і формою при дії кліноостатування та збільшенні доз опромінення.

Оцінка обґрунтованості і достовірності наукових положень та висновків

Рецензована робота С. М. Романчук є завершеним самостійним науковим дослідженням, у якому в поєднанні з теоретичними узагальненнями вирішено

актуальне наукове завдання щодо участі гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ER-тілець та їх високо специфічного компонента ферменту β -глюкозидази у відповідях рослинних клітин на дію кліноостатування та X-Опромінення й толерантності проростків *A. thaliana*, що істотно поглиблюють теоретичні і практичні положення клітинної біології, цитології, гістології рослин, а також космічної біології.

Детальний аналіз представлених рукопису та автореферату дисертації дає підстави констатувати ідентичність автореферату й основних положень дисертації. Наведені в авторефераті наукові результати і висновки в повному обсязі розкриті й обґрунтовані в тексті дисертації. Матеріали дисертації і автореферату викладено логічно і послідовно, на належному професійному рівні. Робота є цілісною, викладена грамотно, достатньо проілюстрована фотографіями, графіками, рисунками і схемами, які підтверджують вирішення поставлених завдань.

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.

Основні результати дисертації достатньо апробовані на міжнародних конференціях (Україна, Росія, Італія, Польща, Бельгія, Словенія, Нідерланди), обсяг друкованих робіт та їх кількість відповідають вимогам МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Зауваження, міркування, побажання до дисертації С. М. Романчук стосуються переважно некоректних висловів та деяких дискусійних питань. Вони не знижують високого рівня дисертації і не можуть вплинути на позитивну оцінку дисертаційного дослідження.

Висновок офіційного опонента

З огляду на актуальність, новизну, важливість отриманих наукових результатів, їх обґрунтованість та достовірність, а також теоретичну і практичну цінність узагальнень, вважаю, що дисертація Романчук Світлани Миколаївни є самостійним, оригінальним дослідженням, виконаним на високому науковому та методичному рівні, у котрому отримані нові наукові факти та результати, які сприятимуть розвитку нових досліджень у космічній біології та використанню молекулярного маркера метаболічної адаптації рослин до умов вирощування в біорегенеративних системах життєзабезпечення космонавтів у тривалих місіях у далекому космосі.

Дисертація Романчук Світлани Миколаївни “Експресія гена β -глюкозидази та ультраструктура тілець ендоплазматичного ретикулуму в клітинах кореня *Arabidopsis thaliana* під впливом кліноостатування та іонізуючої радіації”, є піонерною щодо комплексного вивчення участі у відповідях клітин на дію мікрогравітації та іонізуючого випромінювання гранулярного ендоплазматичного ретикулуму, ER-тілець та їхніх компонентів на клітинному і молекулярному рівнях проростків коренів *A. thaliana*.

На цій підставі вважаю, що робота відповідає вимогам до кандидатських дисертацій ДАК МОН України, а її автор Романчук Світлана Миколаївна заслуговує на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю цитологія, клітинна біологія, гістологія (091 – біологія) – 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.

2 червня 2020 р.

