

ВІДГУК

**офіційного опонента Лихолата Юрія Васильовича
на дисертаційну роботу Шевченко Галини Валеріївни
«Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації
та гіпоксії», представлену на здобуття наукового ступеня доктора
біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія**

Актуальність теми дисертації та її зв'язок з напрямками науково-дослідних робіт. З розвитком космічних польотів, особливо довготривалих дослідницьких, постає завдання вирощувати рослини у штучних закритих екосистемах з метою отримувати врожаї сільськогосподарських культур для харчового забезпечення команди. Це створює актуальність вивчення реакцій рослин на фактори космічного польоту, насамперед, на мікрогравітацію – менший за 1g вплив сили тяжіння. Завдяки своїй здатності швидко реорганізовуватися цитоскелет є тим компонентом, який безпосередньо задіяний у реагуванні та формуванні відповіді клітини на зміну сили тяжіння. Розташування у кортикальному просторі клітини, зв'язок із цитоплазматичною мембраною та клітинною стінкою обумовлює участь динамічних елементів цитоскелету, а саме, мікротрубочок і актинових філаментів у клітинному сигналінгу, який активується як у відповідь на зовнішні фактори, так і на внутрішньоклітинні зміни метаболізму. Оскільки еволюційно цитоскелет сформувався в умовах земного тяжіння, запропоновані автором дослідження організації та реорганізації його елементів в умовах мікрогравітації надає можливість глибше дізнатися про реакції та адаптацію рослинної клітини до зовнішніх стимулів. Ширше розкрити це питання дозволяє дослідження регуляторних білків, які асоційовані з мікротрубочками і актиновими філаментами і забезпечують їхнє функціонування і, у цілому - динамічні перебудови цитоскелету. У зв'язку з цим автором підібрані представники тих груп білків, які регулюють взаємозалежну організацію елементів цитоскелету а також їхнє сполучення із цитоплазматичною мембраною і клітинною стінкою.

Слід зазначити, що в умовах космічних польотів через зміну конвекції повітря рослини потерпають також і від гіпоксії. Актуальність вивчення функціонування елементів цитоскелету у процесі розвитку гіпоксії впливає із його малодослідженості. У зв'язку з цим запропоновані в якості моделі повітряно-водні рослини, корені яких знаходяться у воді, є вдалим об'єктом, оскільки у таких рослин гіпоксія розвивається у природних умовах.

Мета дисертації Шевченко Г. В. визначити роль кортикальних

мікротрубочок, актинових філаментів та експресії генів асоційованих білків цитоскелету у реакціях клітин коренів рослин на модельовану мікрогравітацію та гіпоксію відповідає темі дослідження а перелік завдань є логічним та достатнім для досягнення мети. Підібрані рослинні об'єкти (однодольні *Z.mays*, *A. plantago – aquatica* та дводольні *B. vulgaris*, *A.thaliana*, *S.latifolium* та *S. sisaroides*) сприяють повнішому розкриттю мети. Дослідження функціонування цитоскелету в умовах механічного стресу має практичне значення оскільки визначає механізм міцності рослини під факторів середовища, як то вилягання рослин від буревіїв.

Дисертаційна робота Шевченко Г. В. виконувалася у рамках фундаментальних науково-дослідних робіт відділу клітинної біології та анатомії Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України за держбюджетними темами: «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., дисертант – керівник і виконавець), а також за допомогою грантової підтримки програми з обміну науковими кадрами IRSES 612587 (2013-2017), (Рамкова програма7, Дії Марії Кюрі).

Усе вищезначене дає підставу визнати тему дисертаційної роботи Шевченко ГВ «Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії» актуальною у теоретичному та практичному сенсі.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота Г. В. Шевченко є цілісним завершеним науковим дослідженням. Аналіз дисертації свідчить, що пошукачем виконано доволі ґрунтовний об'єм експериментальної роботи із залученням багатьох методів клітинної (світлова, електронна та конфокальна мікроскопія, імуногістохімія) та молекулярної (виділення ДНК, полімеразна ланцюгова реакція) біології та критично осмислене його теоретичне підґрунття, що відображає цитування 537 наукових джерел. Наукові

гіпотези підтвержені достовірними результатами, рисунками та обґрунтованими узагальненнями.

Наукові положення та висновки дисертації є результатом комплексного підходу до висвітлення впливу стресових факторів космічного польоту на рослини, зокрема, на цитоскелет. Насамперед, представлено дослідження організації цитоскелету у корі коренів рослин *B. vulgaris*, *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* (Розділ 4) та порівняно його з організацією вже широко досліджених *Z. mays* та *A. thaliana*, на основі чого зроблений висновок про типову організацію елементів цитоскелету у кортексі клітин вищих рослин. Виявлено, що безпосередній вплив модельованої мікрогравітації на клітини коренів призводить до рандомізації кортикальних мікротрубочок і це позначається на дискоординації росту коренів (Розділ 4). Поставлене питання яким чином регулюються перебудови кортикального цитоскелету при механічному стресі від кліностакування вирішується дослідженням експресії асоційованих білків цитоскелету, що є індикатором їхнього залучення у функціонування мережі цитоскелету. Досліджується експресія генів, які кодують як структурні складові цитоскелету (ACT2, TUA6), так і ті білків, які координують взаємодію цитоскелету із цитоплазматичною мембраною (FH1, PLDdelta) і клітинною стінкою (FH4), що надає змогу визначити вплив зміненої сили тяжіння на ці компоненти (Розділ 5). Вибір повітряно-водних рослин *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* у коренях яких розвивається гіпоксія і які також зазнають впливу зміненої сили тяжіння через ріст у воді є вдалим з точки зору визначення яким чином може відбутися пристосування до умов космічних польотів (мікрогравітації та зміни конвекції повітря) у природі (Розділ 6). Всебічний аналіз результатів експериментальної роботи дозволив автору сформулювати підґрунття для власних теоретичних положень та висновків а також схематичного представлення розвитку адаптивних реакцій цитоскелету до модельованої мікрогравітації та гіпоксії (Розділ 7).

Новизна наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Серед наукових результатів, які вперше представлені в ході дисертаційного дослідження відповідно до окресленої сети і завдань, відмітимо наступні: 1) проведене дослідження організації кортикальних мікротрубочок і актинових філаментів на послідовних стадіях розвитку клітин коренів у таких рослин як *B. vulgaris*, *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium* і визначена подібність організації елементів цитоскелету у клітинах ростових зон коренів вищих рослин; 2) визначено, що в результаті кліностакування відбувається часткова

дезорієнтація кортикальних мікротрубочок у клітинах дистальної зони розтягу коренів *B. vulgaris*, *Z. mays* та *A. thaliana* і припускається внесок такої дезорієнтації у зміну темпів росту коренів; 3) виявлена знижена експресія генів, які кодують мономери тубуліну (*TUA6*) та білок CLASP (*CLASP*), що може порушувати полімеризацію мікротрубочок та спричиняти дезорганізацію їхньої мережі при механічному стресі; 4) відзначена специфічність формування типів аеренхіми коренів таких повітряно-водних рослин як *A. plantago-aquatica* та *S. latifolium*; 5) встановлені етапи розвитку програмованої клітинної загибелі у клітинах кореня у процесі розвитку аеренхіми, на яких відбувається руйнування кортикальних та ендоплазматичних мікротрубочок; 6) оцінений опосередкований вплив окиснювального стану мембрани на перебудови актинових філаментів при розвитку аеренхіми коренів; 7) запропонована схема реакції цитоскелету на кліностатування і його участі у формуванні адаптаційної відповіді до даного типу механічного стресу.

Ідентичність реферату та основних положень дисертації. Дисертацію та реферат оформлено відповідно до вимог МОН України. Реферат викладено у науковому стилі літературною мовою. Він повною мірою відображає зміст дисертації, структуру та головні положення. Зміст реферату ідентичний основним положенням дисертації та стисло відображає її зміст.

Повнота викладу основних наукових результатів роботи в опублікованих працях. Дані експериментальної роботи, викладені у розділах (4-6), оприлюднені повною мірою у низькі публікацій, які всебічно розкривають тематику розділів. Усього за темою дисертаційної роботи у відкритому доступі опубліковано 53 наукові праці, з них 24 статті у фахових виданнях, серед яких 13 статей у журналах рівня квантилів Q1-Q3, 2 розділи у монографіях та 27 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях та з'їздах. Публікації вичерпно відображають отримані результати досліджень.

Практичне значення отриманих результатів. Дані, отримані в результаті експериментальної роботи, є внеском у розуміння механізмів реакцій рослин на абіотичний стрес, насамперед, при впливі таких факторів як механічне навантаження та нестача кисню. Це надає широкі можливості для розвитку космічного рослинництва, де результати роботи можна враховувати при розробці умов вирощування, ґрунтових композицій та наданні необхідної аерації у закритих екологічних системах. Дані щодо реакції цитоскелету на

навколишні стимули можуть бути цінними для біотехнології сільськогосподарських культур при протидії такій проблемі як вилягання рослин в результаті буревіїв а також їхньої адаптації до гіпоксії, що виникає при затопленні полів. Представлені теоретичні положення можуть бути використані також у навчальних у курсах з клітинної, молекулярної та космічної біології рослин.

Структура та обсяг дисертації, стиль викладу та оформлення, відповідність зазначеній спеціальності. Представлена робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень (три розділи), аналізу та узагальнення, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаних джерел складається з 537 найменувань. Обсяг основного тексту дисертації відповідає вимогам та складає 293 стандартні сторінки.

Розділи I та II є оглядом літературних джерел щодо уявлень про функціонування мікротрубочок, актинових філаментів та сигнальні шляхи за їх участю, а також взаємозалежне функціонування елементів цитоскелету у реакціях на дію стресових чинників. У розділах надано інформацію про моделювання умов космічного польоту на Землі, а також про встановлені перебудови мікротрубочок та актинових філаментів в умовах реальної мікрогравітації, кліностатування та у процесі розвитку аеренхіми від клітинної гіпоксії. Відзначені також маловивчені питання у області дослідження цитоскелету.

У розділі III описано використані матеріали і застосовані методи досліджень, зокрема, моделювання умов мікрогравітації за допомогою кліноставів та експериментальні методи обробки рослинного матеріалу включаючи методики клітинної, молекулярної біології а також біохімії та статистики.

У розділі IV представлено дані власних експериментів стосовно впливу кліноставування на організацію цитоскелету на послідовних стадіях диференціації клітин коренів *Z.mays* та *B.vulgaris*. Наведено результати експериментів по дослідженню впливу інгібіторів актину (цитохалазин) і тубуліну (таксол) на організацію цитоскелету у ростових зонах та на ріст коренів у цілому. Виявлено активацію специфічного механізму стабілізації росту при змінній силі тяжіння, спрямованого на забезпечення життєдіяльності коренів за стресових умов. Результати, висвітлені у розділі, надруковані у 6 статтях та одній монографії.

Розділ V присвячено дослідженню взаємозалежної організації мікротрубочок і актинових філаментів у зоні розтягу коренів *A.thaliana*. На підставі інгібіторного аналізу зроблено висновок про перехресну взаємодію між елементами цитоскелету. Представлені дані стосовно експресії генів, які кодують білки-регулятори організації цитоскелету коренів *A. thaliana*, зокрема, *TUA6*, *ACT2*, *MAP65-1*, *CLASP*, *PLDd*, *FH1* та *FH4*. Відмічено зв'язок між організацією мікротрубочок та експресією генів *TUA6*, *ACT2*, та *CLASP* а також між організацією актинових філаментів та експресією генів *MAP65-1*, *FH1* та *FH4* і виявлено, що такий зв'язок проявляється при кліноостатуванні лише частково. Результати розділу представлено у 15 статтях та у двох розділах монографій.

У Розділі VI висвітлено результати новітнього дослідження організації елементів цитоскелету у рослин *A. plantago-aquatica* та *S.latifolium* при формуванні аеренхіми коренів за умов гіпоксії. Визначені типи утворення аеренхімних порожнин та особливості організації мікротрубочок та мікрофіламентів при формуванні схизогенної та лізигенної аеренхіми. Порівняно організацію мікротрубочок при формуванні аеренхіми лізигенного типу у природніх умовах (*S.latifolium*) та штучно індукованих нестачею поживних речовин (*Z.mays*).

На основі дослідження перикисного окиснення мембрани висловлено припущення про специфіку функціонування актинових філаментів при формуванні аеренхіми лізигенного типу. Представлено схеми участі актинових філаментів і мікротрубочок у розвитку аеренхіми різного типу. За результатами, представленими у розділі, опубліковано 6 статей.

Розділ VII містить узагальнення результатів власних досліджень на основі аналізу відомих положень про сигнальні реакції клітини у відповідь на дію мікрогравітації та розвиток гіпоксії. Проведено широкий аналіз літературних джерел щодо етапів участі елементів цитоскелету у сприйнятті та передачі стресових сигналів та формуванні адаптаційної відповіді рослин. Представлено модель формування адаптаційної відповіді на механічний стрес від кліноостатування за участю цитоскелета та зроблені загальні висновки щодо подібності організації мікротрубочок при реакції клітини на модельовану мікрогравітацію та дію гіпоксії. Окреслені перспективи розвитку подальших досліджень у цій галузі.

Текст дисертаційної роботи написано науковим стилем, викладення матеріалу зрозуміле і логічне, експериментальні дані проілюстровані та статистично обґрунтовані. Дисертаційна робота відповідає спеціальності 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Запитання, зауваження та коментарі:

1. Чому при проведенні експериментальної роботи використано гібрид кукурудзи LG 11, отриманий від Semences SA (Chappes, France), а не гібрид вітчизняної селекції?

2. При статистичній обробці щодо обчислення росту коренів, наприклад, табл. 5.4 (стор. 151), порівняні вибірки різного об'єму (контроль та при кліностауванні). З чим це пов'язано?

3. Чим зумовлений вибір досліджуваного гену тубуліну *TUA6*?

4. Чи змінюється кількість білків цитоскелету в умовах модельованої мікрогравітації?

5. При дослідженні перекісного окиснення ліпідів як окиснювального мембранного процесу, розвиток якого може призводити до реорганізації актинових філаментів, у суходільних та повітряно-водних генотипах рослин *A. plantago-aquatica*, а також у *S. latifolium* та *S. sisaroides* дисертантка обмежилася визначенням тільки ТБК-активних продуктів. Чи є це достатнім, щоб робити загальні висновки?

6. Уточніть, будь ласка, встановлена Вами відмінність взаємозв'язку між станом цитоскелету та експресією генів його певних структурних та асоційованих білків, що є проявом адаптації до механічного стресу, викликаного зменшеним гравітаційним навантаженням на кортикальну зону клітини і вказує на залучення білків у цей процес, носить специфічний чи неспецифічний характер?

7. Враховуючи, що робота має як теоретичний, так і прикладний напрям, бажано було б виділити окремий розділ «Практичні рекомендації».

Загальний висновок і оцінка дисертації щодо її відповідності чинним вимогам до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Дисертаційна робота Шевченко Г.В. «Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії» є завершеним науковим дослідженням, виконаним на актуальну тему. Вона містить теоретичні положення, узагальнення і висновки а також рекомендації щодо практичного застосування результатів, отриманих в результаті експериментальної роботи впродовж тривалого часу. У своїй сукупності зв'язок об'єктів, предмету, мети, завдань, методів і наукові результати дозволили обґрунтувати вплив механічного стресу від модельованої гравітації на цитоскелет, який виникає від зняття навантаження на кортикальну область клітини та визначити етапи участі цитоскелету у реакції на гіпоксію.

За своєю актуальністю, новизною, обґрунтованими науковими результатами, визначенням перспективних практичних напрямів і повнотою представлення дисертаційна робота «Цитоскелет в процесі адаптації рослин до модельованої мікрогравітації та гіпоксії» відповідає вимогам наказу

Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог до оформлення дисертацій» та вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого Постановою Кабінету міністрів України від 17 листопада 2021 року №1197, а її автор Шевченко Галина Валеріївна, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.11 — цитологія, клітинна біологія, гістологія.

Офіційний опонент:

доктор біологічних наук, професор,
завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин,
Дніпровський національний університет
імені Олеся Гончара



Юрій ЛИХОЛАТ

Засвідчую:

Вчений секретар
Дніпровського національного університету
імені Олеся Гончара



Тетяна ХОДАНЕН