

ВІДЗИВ ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Кривохижої Марини Вікторівни

«Вплив іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на цвітіння рослин *Arabidopsis thaliana*», представленої на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія

Завдяки широкому використанню ядерних технологій у різних галузях діяльності людини відбулося і продовжує відбуватися глобальне та регіональне забруднення довкілля штучними, тривалоіснуючими, біологічно-небезпечними радіонуклідами. Це спричиняє ураження представників рослинного і тваринного світу на різних рівнях організації їх біологічних систем. Особливого значення набувають цитогенетичні та генетичні ефекти, які є наслідком порушень стабільності геному, з високою ймовірністю прояву у вигляді збільшення частоти мутацій, зниження репродуктивної здатності та випадання з біоценозів окремих видів.

Дисертаційна робота Кривохижої Марини Вікторівни присвячена вивченню ефектів різних режимів іонізуючого та ультрафіолетового-С випромінювань на час цвітіння різущки Таля та експресію ключових генів фотоперіодичного механізму регуляції цвітіння, а також генів репарації, проліферації та детермінації флоральних меристем.

Рукопис дисертації складається зі вступу, чотирьох розділів, узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 148 сторінок, який містить 26 рисунків, 26 таблиць, а також 158 цитованих джерела.

У вступній частині обґрунтовується важливість і актуальність вивчення впливу різних типів випромінювань на фертильність рослин агроландшафтів, які можуть спричиняти важкі негативні наслідки для продукційної функції рослин, одним з ключовим процесів якої є стадія цвітіння. Враховуючи, що у морфогенезі рослин, вона є однією з найбільш чутливих до стресових факторів, це обумовлює ключове значення цвітіння в оптимальні терміни для загального

онтогенезу рослин. У цій частині дисертантка також надає характеристику різущки Таля та описує важливість вивчення генів, які пов'язані з циркадним годинником, генів – супресорів фотоперіодичної активації цвітіння, флорального фактору, а також детермінації апікальних меристем.

Завдання, які поставлені у вступній частині роботи, відповідають поставленій меті, методологічно обґрунтовані та вірні.

У 1-му розділі дисертації «Огляд літератури» авторкою детально обговорюється вивченість проблеми за темою своєї роботи. Наведено аналіз джерел, що описують вплив рентгенівського, гамма- та ультрафіолетового випромінювання на рослини, а також особливості дії різних режимів опромінення. Розглянуто механізми генетичної регуляції переходу до репродукції у різущки Таля за дії іонізуючого опромінення. Наведено опис фотоперіодичного механізму, який є основним шляхом регуляції переходу до генеративного розвитку рослини, яка використовується у дослідженнях. Особливої уваги приділено важливості вивчення впливу хронічного опромінення у сучасній радіобіології. Проаналізовано результати попередніх досліджень щодо впливу різних типів випромінювання на генеративний розвиток рослин та активність ключових генів цвітіння відповідно різних фаз морфогенезу. Обґрунтовано використання методології аналізу експресії генів.

У розділі «Матеріали і методи досліджень» авторкою наведено відомості щодо рослинного матеріалу, який використовували, та умов його культивування. Надана детальна методологія, яку використовували для ідентифікації та інтерпретації фенотипічних і фенологічних відмінностей у рослин, що виникають внаслідок генетичних змін та/або дії стресових факторів. Дана характеристика освітлення, а також режимів іонізуючого та УФ опромінення рослин. Наявний детальний опис методики екстракції загальної РНК, отримання кДНК, а також молекулярно-генетичного аналізу, який дозволив з'ясувати відносну експресію досліджених генів.

Третій розділ дисертації присвячений впливу іонізуючого випромінювання на цвітіння рослин. Розглянуто вплив низьких доз

рентгенівського опромінення на експресію генів фотоперіодичного механізму. Встановлено наявність узгодженості у відповіді часу цвітіння рослин та активності генів фотоперіодичного шляху та диференціації флоральної меристеми. За гострого опромінення у дозі 3-15 Гр виявлено нелінійну залежність дії іонізуючого випромінювання на активність досліджених генів. Опромінення у дозі 3 Гр в незначній мірі стимулює гени цвітіння, проте, доза 6 Гр викликає різке підвищення рівня експресії всіх генів. За подальшого підвищення дози до 9 та 15 Гр загальний профіль експресії генів зменшується.

Дослідження участі шляхів жасмонатного сигналіngu у регуляції генів цвітіння за дії іонізуючого опромінення дозволило виявити певні відмінності у вегетативних показниках дослідних груп. Встановлено, що у мутантів *jin1*, дефектних по чутливості до жасмонової кислоти, за опромінення у дозі 5 Гр спостерігається істотне збільшення довжини квітконоса порівняно з контрольною групою, але при хронічному опроміненні, істотних змін не виявлено. При порівнянні груп дикого типу та мутантів виявлено, що у проростків дикого типу довжина квітконоса була більшою ніж у мутанта *jin1*. В той же час аналіз експресії досліджуваних генів показав наявність різниці у профілях експресії генів у різних груп та відмінності між контрольними та дослідними групами.

Експериментальними дослідженнями впливу хронічного опромінення на фотоперіодичний механізм дисертанткою встановлені певні фенологічні відмінності між контрольною і експериментальною групами. У проростків рослин, опромінених у дозі 3 сГр, фаза цвітіння (6.3) наступала в середньому на 8 діб раніше, порівняно з контрольною групою. Проте, у рослин опромінених у дозі 17 сГр цвітіння наступало в середньому на 14 діб пізніше. Важливо зазначити, що дані фенологічних спостережень узгоджуються з даними молекулярно-генетичних досліджень. Безсумнівно важливим результатом цієї частини досліджень є те, що хронічне опромінення впливає на гени фотоперіодичного механізму в більшій мірі, ніж гостре. Показано, що хронічне опромінення, за збільшення дози у 5 разів (з 3 до 17 сГр) викликає

протилежний ефект на початок переходу до репродуктивного розвитку та на експресію генів цвітіння. Цікавим є те, що хронічне опромінення в дозі 17 сГр має більш виразний ефект ніж за гострого опромінення. За дії малих доз хронічного опромінення (3 сГр) стимулюється активність репараційних процесів, що відбувається після активації процесів поділу клітин. Проте, при підвищенні дози до 17 сГр процеси репарації пригнічуються.

Підрозділ, присвячений зміні експресії генів цвітіння у відповідь рослин на УФ-С за різних умов освітлення в умовах *in vitro*, дозволив з'ясувати, що проростки, вирощені в освітленні фіолетового та оранжевого спектру мають затримку у розвитку до 6 діб. Найшвидші темпи розвитку характерні для рослин, які вирощені при інтенсивному білому освітленні: фазу стрілкування (5.1) спостерігали на 17 добу, фазу квітування (6.1) спостерігали на 20 добу, а фазу цвітіння (6.3) – на 23 добу. Для проростків, що культивували при червоному та фіолетовому освітленні, перехід до фази 5.1 спостерігали на 20 добу, а стадію цвітіння 6.1 спостерігали на 23 добу. Рослини, які культивували в умовах оранжевого та фіолетового освітлення досягли фази розвитку 5,1 на 24 добу. Характер змін експресії генів фотоперіодичного шляху за дії УФ-С може вказувати на стабілізуючу дію криптохромів та фототропінів на генетичні механізми регуляції цвітіння. Встановлено, що рослини, які були вирощені в освітленні червоного спектру, показали зниження рівня експресії як генів цвітіння, так і маркеру репараційних процесів. Оскільки видиме червоне світло поглинається фітохромами, авторка припускає, що ці пігменти приймають участь у регуляції цвітіння рослин в умовах неповного спектру освітлення.

Останній підрозділ експериментальної частини дисертації присвячений дослідженню змін експресії генів цвітіння рослин, вирощених у ґрунті за різних умов освітленості у відповідь на УФ-С. Встановлено, що рослини, в умовах білого освітлення та температури 24 °С, вступали до фази бутонізації (5.1) на 24 добу вегетації. Перехід до фази цвітіння (6.3) – на 27 добу, а стадія плодоношення (8) наступала на 31 добу вегетації та з 36 доби спостерігали початок в'янення рослин. Проростки, вирощені у фіолетовому освітленні, на 31

добу вегетації розпочинали фазу бутонізації (5.1) та на 36 добу 30% рослин мали відкриті квіти. У рослин, вирощених у червоному світлі за таких же температурних умов, фазу бутонізації (5.1) спостерігали на 27 добу вегетації, фазу цвітіння (6.1) – на 31 добу, а стадію плодоношення (8) - на 36 добу від посадки. Загалом було виявлено зміни в експресії генів фотоперіодичного шляху регуляції цвітіння, які залежать від умов освітлення. Активність репараційних процесів після дії УФ-С має відмінності серед груп зразків, які вирощували в білому, фіолетовому і червоному освітленні. Авторка вважає, що різниця між групами може бути викликана участю криптохромів або, навпаки, фітохромів, що залежить від спектру світла в якому вирощували рослини.

Дисертаційна робота виконана в рамках низки наукових тем відділу біофізики і радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, а також в рамках наукових програм міжнародних обмінів Марії Кюрі та стажування за стипендією уряду Словацької Республіки.

Істотні недоліки в дисертації й авторефераті відсутні. До деяких зауважень відносяться наступні:

1. Об'єкт та предмет дослідження, сформульовані дисертантом невірно, оскільки об'єкт дослідження – це процес або явище, що породжує проблемну ситуацію й обрано дисертантом для вивчення. Таким чином, проростки арабідопсіса не можуть виступати в якості об'єкта досліджень. Предмет же дослідження міститься в межах об'єкта і також сформульований невірно.

2. Наукова новизна роботи в авторефераті та вступній частині рукопису дисертації практично не розкрита автором.

3. У підрозділі огляду літератури щодо дії хронічного та сублетального гострого випромінювання на біологічні системи автор посилається практично тільки на публікації співробітників відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Безумовно, відділ має дуже вагомий напрацювання у цій галузі, але було б доцільно згадати також публікації співробітників Науково-дослідного інституту сільськогосподарської радіології та агроєкології (м. Обнінськ), а також Інституту екології рослин і

тварин (м. Єкатеринбург), зокрема, С.М. Гераськіна, А.Н. Удалової, В.М. Позолотіної, О.В. Антонової та інших, більшість робіт яких присвячена саме генетичним ефектам хронічного впливу іонізуючого опромінювання у наземних рослин.

4. На сторінках 50 і 51 наведені дві напівлетальні дози для *A. thaliana* без зазначення літературного джерела. Перша доза 150 Гр «для *A. thaliana*» і друга – 300 Гр «для проростків *A. thaliana*». Хотілось би дізнатися з чим пов'язані такі розбіжності?

5. В підрозділі 2.4. «Характеристика опромінення ІВ рослин» розділу «Матеріали і методи досліджень» вказано, що «хронічне опромінення відбувається за рахунок радіації $^{137}\text{CsCl}$ з загальною дозою 3 та 17 сГр». Проте у тексті дисертації неодноразово з'являється також доза 30 сГр, а у першому висновку при описі затримки цвітіння вказана доза «17 сГр та більше». Тож яким дозам хронічного опромінення піддавали проростки рослин?

6. Дуже невиразною в роботі є частина, яка присвячена безпосередньо лабораторним дослідженням, які б мали підтвердити вплив експресії або супресії ключових генів детермінації цвітіння рослин на зміни часу цього важливого показника після дії іонізуючого опромінення у гострих та хронічних дозах.

7. Головним зауваженням до роботи та її певним недоліком, на наш погляд, є те, що вона містить декілька блоків досліджень, які, безумовно, об'єднує загальна тематика роботи, але вони існують в роботі майже незалежно один від одного і зовсім не проаналізовані автором у порівняльному аспекті. В першу чергу це стосується розділів роботи, присвячених впливу іонізуючого та ультрафіолетового випромінювань. На жаль ні в заключній частині роботи, ані у висновках авторка не робить порівняльного аналізу впливу цих важливих чинників. Оскільки вказані чинники можуть за певних умов діяти одночасно, дуже доречним, логічним і очікуваним було б вивчення їх сумісної дії, що надало б вельми багатий і дуже корисний матеріал для багатофакторного аналізу отриманих результатів. †

8. Щодо висновків, які безсумнівно є новими і важливими. Зазвичай передбачається, що всі головні висновки, які автор наводить наприкінці роботи, є результатом оригінальних досліджень, які виконані вперше. Тому, мабуть, не є необхідним зосереджувати на цьому увагу майже у кожному висновку. Тим більш, що коли авторка у частині висновків це не підкреслює, то може виникнути питання, а чи вперше вони отримані?

До певних недоліків оформлення роботи слід віднести наступні:

1. Більш ніж 15 таблиць містять громіздкі примітки, які повністю ідентичні для всіх таблиць. У таких випадках зазвичай у примітках до першої таблиці пишуть «тут і в табл. (перераховуються номери таблиць)» – далі наводяться безпосередньо примітки, які автор бажає зробити.

2. «ЖасмонаТи» чи «жасмонаДи», або «жасмонаТний» чи «жасмонаДний» сигналінг? Слово або словосполучення зустрічається в тексті не один десяток разів але авторка так і не визначилася як правильно писати цю групу гормонів.

3. Декілька оригінальних рисунків, а також таких, що виконанні авторкою, наведено у тесті англійською мовою.

Проте перераховані зауваження не знижують наукової значущості дисертаційної роботи, в результаті виконання якої вперше показано високу супресію генів детермінації цвітіння в умовах хронічного опромінення, наявність нелінійної залежності зміни експресії генів фотоперіодичного механізму за дії сублетальних доз іонізуючого випромінювання. Вперше продемонстровано вплив спектру світла, при якому вирощували дослідні рослини, на активність генів фотоперіодичного шляху після УФ-С опромінення.

Автореферат адекватно віддзеркалює структуру і зміст дисертаційної роботи, викладеної грамотною науковою мовою і належним чином оформленою. Основний зміст дисертації опублікований у 17 наукових працях, з яких 8 статей: дві статті у періодичних виданнях, індексованих у Scopus та Web of Science та 5 у виданнях, що є у переліку ДАК; та 7 тез у збірках конференцій.

Дисертантка є співавторкою однієї монографії. Основні положення дисертаційної роботи апробовані на наукових зібраннях вітчизняного і міжнародного рівня.

Враховуючи актуальність роботи та її достатню апробацію, вважаю, що дисертація Кривохижої Марини Вікторівни «Вплив іонізуючого та ультрафіолетового випромінювання на цвітіння рослин *Arabidopsis thaliana*» є вагомим за об'ємом отриманих даних, являє собою цілісне, самостійне, закінчене дослідження, а також має високу теоретичну і практичну цінність. Наукові положення і висновки, сформульовані в дисертації, є обґрунтованими, достовірними і новими; викладені в друкованих роботах і апробовані на наукових форумах. Робота є завершеною науковою працею, цілком відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 р. № 567, а її авторка заслуговує на присвоєння наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.01 – радіобіологія.

Завідувач відділу водної радіоекології
Інституту гідробіології НАН України
доктор біологічних наук

Гудков Д.І.

Дідис Гудкова Д.І.



22.11.19