

В І Д Г У К
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Шклярєвського Максима Анатолійовича
«Функціональна взаємодія фітогормонів і газотрансмітерів при
адаптації рослин до абіотичних стресорів»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії за
спеціальністю 091 "Біологія".

Актуальність теми дисертаційної роботи. Дисертаційна робота Шклярєвського М.А. присвячена з'ясуванню ролі функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою, з іншими сигнальними посередниками і стресовими фітогормонами у регуляції адаптивних процесів у рослин.

Актуальність вивчення адаптивних реакцій рослин на дію стресових чинників у теперішній час зумовлена як глобальним характером кліматичних змін, так і низкою соціально-економічних причин, найважливішими з яких є необхідність збільшення виробництва продовольства для геометрично зростаючої кількості населення. Розширення посівних площ відповідно призводить і до зростання територій, на яких рослини зазнають впливу посухи і гіпертермії. Аналіз реакцій рослин на вплив несприятливих умов середовища сприятиме кращому розумінню закономірностей адаптації рослин. В свою чергу, це відкриває перспективи для нових напрямів селекції і біотехнологій.

Відомо, що у відповідь на абіотичні стреси, такі як наявність важких металів у ґрунті, засолення, посуха та екстремальні температури, рослини, як правило, реагують посиленням генерації активних форм кисню (АФК). Синтез АФК змінює клітинний окиснювально-відновний гомеостаз і призводить до окиснювального стресу у рослин. АФК є потенційно токсичними, але у помірних концентраціях виконують сигнально-регуляторні функції. Для захисту від стресу рослини вивільняють сигнальні молекули, які ініціюють каскад реакцій адаптації. Зокрема, коли концентрація АФК стає токсичною для рослини, монооксид азоту (NO) може діяти як детоксикант і мінімізувати шкідливі ефекти. Такими ж сигнальними речовинами також вважають газотрансмітери сірководень (H₂S) та монооксид вуглецю (CO), роль у реакціях рослин на абіотичні стреси досліджена ще недостатньо.

У реакції рослин на дію стресів також беруть участь гормони. Відомо, що сигнальні посередники можуть індукувати як зміни у гормональному статусі, так і брати участь у трансдукції гормональних сигналів. Отже, адаптація рослин до дії стресових чинників включає в себе складну функціональну взаємодію між мережею сигнальних посередників і фітогормонів.

Дослідження механізмів такої взаємодії почалися лише останніми роками. Зокрема, не відома роль жасмонатного сигналіngu в прояві стрес-протекторної дії на рослини газотрансмітерів.

Отже, тема дисертаційної роботи по дослідженню ролі функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою, з іншими сигнальними посередниками та



компонентами гормональної системи рослин у регуляції адаптивних процесів у рослин є вчасною та актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах науково-дослідних тем кафедри ботаніки і фізіології рослин Харківського національного аграрного університету ім. В.В. Докучаєва: «Роль сигнальних посередників і сполук з гормональною активністю у формуванні адаптивних реакцій рослин на абіотичні стресори» (№ держреєстрації 0117U002427) та «Механізми індукування компонентів стрес-протекторної системи рослин» (№ держреєстрації 0117U002514), а також гранту за програмою «Grants for Multidisciplinary research teams 2020 of Ministry of Foreign Affairs of the Czech Republic. Direction curator – Czech University of Life Science, Prague» (проекту Czech Republic Development Cooperation «Платформа AgriSciences для розвитку науки у вищих навчальних закладах України»).

Наукова новизна представлених у дисертації результатів. Вперше встановлено ефект індукування розвитку теплостійкості інтактних проростків пшениці дією донора монооксиду вуглецю – геміну. З'ясовано, що найбільш раннім ефектом, який відбувається за впливу донора монооксиду вуглецю на клітини коренів проростків, є кальційзалежне зростання вмісту оксиду азоту, асоційоване зі збільшенням активності нітратредуктази, а подальшим – зростання вмісту пероксиду водню, пов'язане з підвищенням активності позаклітинної пероксидази.

Показано участь сірководню як сигнального посередника у реалізації стрес-протекторних ефектів саліцилової кислоти на клітини коренів пшениці за впливу гіпертермії. Доведено причинно-наслідковий зв'язок між зростанням вмісту H_2S і підвищенням активності антиоксидантних ферментів в коренях проростків пшениці за дії саліцилової кислоти.

Вперше виявлено, що посилення стрес-протекторної дії стресового фітогормону 24-епібрасиноліду (24-ЕБЛ) при використанні в комбінації з донором NO нітропрусиду натрію у низьких концентраціях зумовлено стабілізацією про-/антиоксидантної рівноваги у клітинах.

З використанням мутантних ліній арабідопсису, дефектних за жасмонатним сигналінгом, вперше експериментально доведено, що ключові білки жасмонатного сигналінгу залучені в реалізацію протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю за умов сольового стресу.

Теоретичне значення результатів досліджень полягає у поглибленні існуючих уявлень щодо механізмів функціональної взаємодії між сигнальними посередниками-газотрансмітерами та окремими стресовими фітогормонами. Отримані результати також можуть бути теоретичним підґрунтям для розробки нових методів підвищення стійкості рослин пшениці до несприятливих чинників навколишнього середовища, зокрема, високих температур і засолення.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані стосовно функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою та з іншими сигнальними посередниками і стресовими фітогормонами у регуляції адаптивних процесів

у рослин мають практичне значення для рослинництва. Практичний інтерес також становить виявлений позитивний ефект комбінованого застосування саліцилової кислоти і донорів сірководню, а також брасиностероїдів і донорів оксиду азоту, що дозволяє посилити стрес-протекторний вплив екзогенних фітогормонів на рослини. Представлений модифікований протокол вирощування рослин арабідопсису у малооб'ємній водній культурі для вивчення стрес-протекторної дії фізіологічно активних речовин, є цінним для практичного скринінгу біологічної активності природних і синтетичних сполук. Результати дослідження функціональних зв'язків газотрансмітерів між собою та з іншими сигнальними посередниками і стресовими фітогормонами у регуляції адаптивних процесів у рослин можуть стати підґрунтям для розробки нових методів та прийомів підвищення стійкості рослин до несприятливих чинників навколишнього середовища.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків, сформульованих у дисертації.

Рукопис дисертації побудований за рекомендованою схемою і складається з анотації, викладеною українською та англійською мовою, вступу, переліку умовних скорочень, огляду літератури, опису матеріалів, умов і методів досліджень, трьох розділів із викладенням результатів експериментів, їх аналізу та обговорення, узагальнення отриманих результатів, висновків і списку використаної літератури з 314 джерел. Отримані результати проілюстровані 31 рисунком, 3 таблицями і 2 схемами.

В анотації викладено головні результати роботи та наведено перелік опублікованих праць за темою дисертації.

У вступі до дисертації обґрунтовано актуальність теми, зв'язок роботи з науковими темами, грантом, сформульовані мета та завдання роботи, методи досліджень, висвітлені аспекти наукової новизни і практичного значення отриманих результатів. Також відображено особистий внесок здобувача та кількість публікацій.

У першому розділі (Огляд літератури) дисертаційної роботи, який складається з 4-х підрозділів, розглянуто та узагальнено сучасний стан досліджень щодо функціонування сигнальної мережі рослинних клітин. Охарактеризовано механізми утворення як одного з більш вивчених компонентів сигнальної мережі клітин рослин і тварин – NO, так і найменш вивченого газотрансмітеру рослинних клітин – монооксиду вуглецю, а також сірководню (H₂S) та їх роль у розвитку адаптивних реакцій рослин на дію стресорів різної природи. Представлено можливі шляхи функціональної взаємодії досліджених газотрансмітерів між собою та з іншими посередниками – іонами кальцію та активними формами кисню. Обґрунтовано необхідність вивчення фітогормонів як важливих компонентів регуляторної системи рослин. Описано роль саліцилової та жасмонової кислот та брасиностероїдів у адаптації рослин до абіотичних стресорів різної природи. Наведено нові дані щодо аналізу функціональних зв'язків газотрансмітерів з фітогормонами в реалізації стрес-протекторних ефектів сигнальних посередників на рослини.

Базуючись на даних сучасних літературних джерел про адаптацію рослин до дії посухи, дисертант виокремив проблемні і маловивчені питання: участь сигнальних посередників та їх розташування в сигнальних ланцюгах, що активуються під дією монооксиду вуглецю, вірогідність залучення білків родин СОІ та МҮС у реалізацію фізіологічної дії сигнальних молекул, вплив комбінованої дії на рослини екзогенних стресових фітогормонів разом з донорами газотрансмітерів, виявлення сигнальної мережи, через яку реалізуються фізіологічні ефекти фітогормонів, а особливо роль у ній газотрансмітерів як важливих посередників.

В огляді літератури також акцентовано на питаннях, які є ще мало вивченими. На основі аналізу стану проблеми обґрунтовано мету досліджень.

Загалом, огляд літератури, що базується на аналізі достатньої кількості, переважно сучасних англійських літературних даних, написано гарною літературною мовою, він є інформативним і добре відображає стан досліджуваної проблеми.

У *другому розділі (Матеріали та методи досліджень)* обґрунтовано вибір та охарактеризовано матеріал для досліджень, описані донори газотрансмітерів, представлено умови проведення дослідів та дизайн експериментів з проростками пшениці та рослин арабідопсису. Описано методики визначення фізіологічних та біохімічних показників, що характеризують виживаність проростків пшениці та оцінку стану біомембран клітин їх коренів, водний дефіцит та вміст фотосинтетичних пігментів у листках арабідопсису. Також представлено опис методик визначення вмісту оксиду азоту, сірководню та активності антиоксидантних ферментів, вмісту проліну та цукрів. Коротко охарактеризовано використані методи статистичної обробки результатів досліджень. Можна відзначити, що дисертант володіє значною кількістю сучасних біохімічних методик.

Результати власних досліджень представлені у *третьому - п'ятому розділах*.

У *третьому розділі (Монооксид вуглецю і адаптація рослин до гіпертермії)* представлені результати дослідження впливу донора монооксиду вуглецю (геміну) на стійкість проростків пшениці до ушкоджуючого прогріву (за температури 45⁰С протягом 10 хв) і функціонування їх стрес-протекторних систем.

Встановлено, що обробка чотиридобових етіюльованих проростків пшениці геміном індукувала розвиток теплостійкості: виживаність проростків через три доби після теплового стресу підвищувалась до більш, ніж 70%, тоді як у контрольному варіанті – вона була дещо вищою 50%. Ефективність геміну, як донора СО, у збільшенні термотолерантності проростків підтверджено близькою до значень у контрольному варіанті виживаністю проростків за дії скавенджера СО – гемоглобіну. Вищу стійкість проростків, що росли в середовищі з геміном, до теплового стресу дисертант пов'язує із зменшенням, порівняно з контрольним варіантом, виходу речовин, що поглинають в ультрафіолетовій частині спектра, яке свідчить про збереження цілісності мембран клітин коренів. Ефективність дії саме геміну підтверджено

також тим, що другий редокс-активний продукт розкладання геміну (Fe^{2+}) не впливав на стан мембран клітин коренів та виживаність проростків після прогріву,

Для аналізу механізмів стрес-протекторної дії донора СО на проростки пшениці, було досліджено вплив донору СО на активність антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази (СОД), каталази та гваяколпероксидази) у коренях проростків пшениці після ушкоджуючого прогріву, порівняно зі звичайними умовами. Встановлено, що через 24 години після ушкоджуючого прогріву активність СОД у коренях проростків з обробкою геміном була на рівні відповідних значень контролю, тоді як 24 годин після початку впливу донора СО вона була істотно вище, ніж у контролі. Виявлено також, що за ушкоджуючого прогріву активність каталази та гваяколпероксидази у варіантах з донором СО була вищою, ніж у відповідному контролі. На підставі цих результатів, дисертант робить висновок, що стрес-протекторна дія донора СО на проростки пшениці може бути пов'язаною із активацією ферментативної антиоксидантної системи.

Наступним етапом роботи було дослідження ролі іонів кальцію та активних форм кисню (АФК) як ймовірних посередників стрес-протекторного впливу донора СО. Достовірність отриманих ефектів автор вдало обґрунтовує застосуванням антагоністів кальцію та скавенджера пероксиду водню, що підтверджували усунення фізіологічної дії монооксиду вуглецю в їх присутності. Встановлено, що через 1 год після початку інкубації вміст пероксиду водню в коренях проростків пшениці відносно контролю підвищувався, а на другу годину – сягав максимальних значень. Динаміка активності гваяколпероксидази у коренях була схожою зі змінами у часі вмісту пероксиду водню. Встановлено, що посилення утворення АФК за дії геміну мало транзиторний характер. Виявлено також, що ефекти індукування обробкою геміном теплостійкості проростків та підвищення в них активності антиоксидантних ферментів усувалися антагоністами кальцію (ЕГТА і неоміцином) та скавенджером пероксиду водню ДМТС. Показано, що гемін, як донор СО, чинив специфічний вплив на генерацію пероксиду водню коренями проростків пшениці: скавенджер СО гемоглобін повністю усував спричинюване обробкою геміном підвищення вмісту H_2O_2 . Посилення генерації АФК під впливом геміну дисертант пов'язує з підвищенням активності позаклітинної ПО, яка може генерувати АФК, в тому числі пероксид водню.

Для аналізу зв'язку між викликаним обробкою геміном підвищенням вмісту пероксиду водню у коренях і збільшенням активності антиоксидантних ферментів було оцінено вплив донора СО на їх активність у присутності скавенджера H_2O_2 ДМТС. Встановлено, що у варіантах з комбінацією ДМТС з геміном активність СОД, каталази та гваяколпероксидази суттєво не змінювалася. Отримані дані свідчать про те, що фізіологічні ефекти донора СО геміну, ймовірно, реалізуються з участю пероксиду водню як сигнального посередника.

Оскільки CO, як сигнальна молекула перебуває у функціональній взаємодії не тільки з АФК, інгібіторним методом було досліджено можливу роль надходження кальцію з позаклітинного простору і внутрішньоклітинних компартментів у цитозоль, в регуляції активності позаклітинної пероксидази і вмісту пероксиду водню у коренях при дії на них геміну.

На основі факту повного або часткового нівелювання змін активності пероксидази і вмісту пероксиду водню, індукованих геміном, у присутності антагоністів кальцію і NO, підтверджено роль кальцію в посиленні утворення пероксиду водню пероксидазою за дії на клітини коренів донора CO.

Оскільки у тісній функціональній взаємодії з АФК та іонами кальцію перебуває така сигнальна молекула як оксид азоту, дисертант дослідив участь оксиду азоту та генеруючих його ферментативних систем у регуляції утворення АФК та індукуванні теплостійкості проростків пшениці дією екзогенного монооксиду вуглецю. Виявлено, що динаміка вмісту NO у варіанті з внесенням в середовище інкубації проростків пшениці геміну та активності нітратредуктази (НР) були схожими. За результатами інгібіторного аналізу і прямого визначення активності НР з'ясовано значний внесок саме цього ферменту в ефект посилення генерації оксиду азоту клітинами коренів при дії донора CO. Транзиторне підвищення вмісту NO у коренях проростків пшениці протягом перших двох годин їх інкубації на середовищі з донором CO геміном, тобто в той же часовий проміжок, коли збільшується вміст пероксиду водню та активність позаклітинної ПО, свідчать про роль оксиду азоту у реалізації стрес-протекторної дії екзогенного CO на проростки пшениці при гіпертермії.

На основі результатів, отриманих за допомогою методу інгібіторного аналізу, представлено схему розвитку сигнальних подій у клітинах проростків пшениці у присутності донора CO геміну.

У розділі 4 (Участь газотрансмітерів у реалізації стрес-протекторної дії на рослини саліцилової кислота і 24-ЕБЛ за умов гіпертермії) досліджено участь газотрансмітерів у реалізації стрес-протекторних ефектів на рослини саліцилової кислоти (СК) та брасиностероїдів.

Дисертантом оцінено участь такого малодослідженого посередника-газотрансмітера як сірководень (H_2S) у фізіологічній дії СК. Виявлено, що як інкубація проростків протягом доби на середовищі з додаванням СК, так і обробка проростків розчинами донора сірководню $NaHS$ викликала підвищення їх стійкості до ушкоджуючого прогріву. Відзначено тимчасове збільшення вмісту сірководню у коренях проростків пшениці, оброблених СК, порівняно з контрольними рослинами, яке може вказувати на можливу участь H_2S у реалізації дії СК.

Оскільки однією з протекторних систем, задіяних у саліцилат-індукованому підвищенні теплостійкості проростків, може бути антиоксидантна система, в роботі було проаналізовано зміни активності СОД, каталази і гваяколпероксидази у коренях проростків пшениці за впливу СК, донором сірководню $NaHS$, антагоністів сірководню і їх різних комбінацій.

Встановлено, нівелювання ефектів СК на активність антиоксидантних ферментів в присутності антагоністів сірководню. Факт усунення позитивного впливу СК на теплостійкість проростків пшениці двома різними інгібіторами L-цистеїндесульфгідрази – основного ферменту синтезу сірководню – засвідчує участь H_2S у реалізації її стрес-протекторної дії. Зменшення накопичення МДА за дії теплового стресу при обробці проростків СК і NaHS дало підстави стверджувати, що індукування теплостійкості проростків пшениці пов'язане з активацією антиоксидантної системи. Таким чином, отримані результати вказують на участь сірководню у реалізації ефектів СК на стійкість проростків пшениці до гіпертермії.

Базуючись на припущенні про можливість посилення захисної дії брасиностероїдів на рослини за допомогою донорів NO, дисертантом проаналізовано можливість посилення стрес-протекторної дії 24-епібрасиноліду (24-ЕБЛ) на проростки пшениці за умов гіпертермії за впливу його комбінованої дії з нітропрусидом натрію в різних концентраціях. Виявлено, що найбільш значне та вище, ніж окремий вплив кожного з них, підвищення теплостійкості проростків викликала обробка сумішшю 20 нМ 24-ЕБЛ і 0,2 мМ НПН. Проте за їх сумісної дії у концентраціях на порядок вище – теплостійкість проростків пшениці, навпаки знижувалася. Отже, встановлено, що ефект синергізму їх стрес-протекторної дії в діапазонах невисоких концентрацій.

Дисертантом з'ясовано, що за внесення у середовище інкубації коренів 24-ЕБЛ і НПН у концентраціях, що чинили захисний вплив, а також їх комбінацій, підвищувалася активність СОД у коренях. При цьому після гіпертермії найвищі значення активності СОД також зберігалися у варіанті з комбінованою обробкою проростків пшениці 24-ЕБЛ і НПН у низьких концентраціях. Таким чином, отримані результати підтвердили робочу гіпотезу про можливість посилення позитивного впливу фітогормону 24-ЕБЛ на теплостійкість рослин за допомогою донора сигнальної молекули NO.

Таким чином, доведено, що стрес-протекторна дія фітогормонів СК і БС може бути підсилена їх застосуванням у поєднанні з донорами газотрансмітерів – сірководню і оксиду азоту, відповідно. При цьому виявлено, що донори газотрансмітерів у низьких концентраціях разом з фітогормонами посилювали вплив останніх на одну з ключових захисних систем клітин – антиоксидантну, зокрема – на активність СОД. На підставі отриманих результатів, дисертант робить висновок про перспективність обробки рослин комбінацією стресових фітогормонів і донорів газотрансмітерів для практичного застосування.

У розділі 5 (Роль компонентів жасмонатного сигналіну в реалізації стрес-протекторних ефектів газо трансмітерів за дії сольового стресу на рослини арабідопсису) досліджено роль ключових білкових компонентів жасмонатного сигналіну (рецептора жасмонату CO11 і транскрипційного фактора JIN1/MYC2) в реалізації стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів за дії сольового стресу, оскільки газотрансмітери перебувають у тісному зв'язку з мережею гормонального сигналіну рослин. Це дослідження було

виконано на іншому об'єкті – арабідопсисі дикого типу (Col-0) та дефектних за жасмонатним сигналінгом мутантних лініях *coi1* та *jin1*.

Встановлено, що передобробка рослин дикого типу донором сірководню (NaHS) значно зменшувала екзоосмос електролітів з тканин листків, тобто сприяла збереженню цілісності мембран, а донором оксиду азоту (нітропрусидом натрію) – чинила подібний мембрано-протекторний ефект на рівні тенденції. В той же час, така обробка мутантів *coi1* і *jin1* донорами H₂S і NO істотно не впливала на проникність мембран клітин листя при сольовому стресі. З'ясовано також аналогічну реакцію передобробки NaHS і НПН на суми хлорофілів *a+b* у листках: істотну у рослин дикого типу та не суттєву у мутантних ліній. Обробка донорами сірководню і оксиду азоту істотно не впливала на вміст каротиноїдів каротиноїдів у листках рослин всіх трьох генотипів.

Незважаючи на різну активність СОД у всіх досліджуваних генотипів, сольовий стрес призводив зниження активності цього ферменту у рослин всіх них. Передобробка NaHS рослин дикого типу сприяла збереженню активності СОД у листках на рівні контролю, а НПН – істотне підвищення, порівняно з контролем. Передобробка рослин мутантних ліній цими донорами не впливала на активність СОД. Аналогічно передобробка донорами H₂S і NO призводила до підвищення активності каталази у рослин дикого типу при дії стресора та не впливала на активність ферменту у мутантів *coi1* і *jin1*. Встановлено, що передобробка рослин дикого типу і мутантів *coi1* донорами сірководню і оксиду азоту достовірно зменшувала стрес-індуковане накопичення проліну в листках, тоді як у рослин генотипу *jin1* – вони не чинили істотного впливу. Обробка мутантних ліній не стабілізувала вміст хлорофілів. Базуючись на цих результатах, дисертант робить висновок, що реалізація протекторної дії оксиду азоту та сірководню пов'язана не лише с транскрипційним фактором JIN1/MYC2, але і з іншими компоненти жасмонатного сигналінгу при сольовому стресі.

У другому підрозділі досліджено впливу донора монооксиду вуглецю геміну на функціонування ферментативної антиоксидантної і осмопротекторної систем арабідопсису дикого типу та мутантних ліній за умов сольового стресу. Як і обробка попередними газотрансміттерами, передобробка донором СО геміном помітно знижувала прояв сольового стресу у рослин дикого типу, а у обох мутантів, дефектних за жасмонатним сигналінгом, ефект не спостерігали, або спостерігали лише тенденцію за такими показниками як водний дефіцит, вміст сумарного хлорофілу та каротиноїдів. Обробка геміном стабілізувала активність каталази і підвищувала активність гваяколпероксидази в стресових умовах лише у рослин дикого типу.

Встановлено також, що у рослин дикого типу за обробки геміном за дії сольового стресу істотно зростав вміст проліну та цукрів. В той же час, виявлено відмінності в реакції на дію донора СО у мутантів за жасмонатним сигналінгом: їх обробка не вплинула на роботу ферментативної антиоксидантної системи та накопичення осмолітів при сольовому стресі.

Отримані результати вказують на залучення компонентів жасмонатного сигналіngu (білків COI1 і JIN1/MYC2) в реалізацію стрес-протекторної дії донорів сірководню, оксиду азоту та монооксиду вуглецю.

В заключному розділі (*Узагальнення результатів*) у стислому вигляді наведені узагальнені результати досліджень щодо ролі основних газотрансмітерів (NO, H₂S, CO) у розвитку адаптивних реакцій рослин на дію стресорів (гіпертермії та сольового стресу).

На підставі власних даних і аналізу літератури дисертантом наведені наочні схеми участі АФК, NO і кальцію в реалізації стрес-протекторної дії на рослини екзогенного монооксиду вуглецю та можливого залучення жасмонатного сигналіngu в реалізацію стрес-протекторних ефектів газотрансмітерів.

Враховуючи вищезазначене, можна резюмувати, що дисертаційне дослідження істотно доповнює фундаментальні знання про роль сигнальних молекул-газотрансмітерів та їх функціональну взаємодію зі стресовими фітогормонами при адаптації рослин до дії абіотичних стресів.

Узагальнюючи можна відзначити, що отримані в ході експериментів результати, висвітлені в експериментальних розділах дисертаційної роботи, дозволили сформулювати та добре обґрунтувати висновки, які відповідають вказаним меті та завданням дослідження. Представлені у дисертаційній роботі результати є новими, оригінальними, вперше отриманими автором з використанням сучасних методів досліджень. Результати всіх експериментів статистично оброблені. Висновки є обґрунтованими і відображають головні досягнення проведеної роботи. Для інтерпретації ролі газотрансмітерів за дії стресів дисертант вдало залучає літературні дані. Дані, представлені на рисунках і у таблицях, мають статистичну обробку.

Повнота викладу основних наукових результатів у опублікованих наукових працях. Результати досліджень висвітлені у 13 наукових публікаціях, з яких – 3 статі у фахових періодичних наукових виданнях, що входять до міжнародної наукометричної бази даних SCOPUS, 5 – у фахових періодичних наукових виданнях України та інших країн та 5 тез доповідей у матеріалах міжнародних наукових конференцій та конгресу. Отримані експериментальні дані, положення й висновки добре висвітлено в опублікованих роботах.

Аналіз тексту дисертації М.А. Шклярєвського дозволяє зробити висновок про відсутність порушення автором вимог академічної доброчесності. У роботі містяться посилання на відповідні джерела інформації у разі використання ідей, розробок, тверджень, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. Зокрема у рецензованій дисертації не виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації.

Анотація повною мірою відображає зміст роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо змісту та оформлення.

Представлена дисертаційна робота Шклярєвського М.А. загалом не має суттєвих недоліків. Водночас є окремі питання, зауваження до обговорення результатів та оформлення дисертації, а саме:

Питання: Стор. 74. З опису даних табл. 3.1: «Після прогріву у контрольному варіанті активність ферменту істотно не змінювалася, а у варіанті з обробкою геміном знижувалася і була на рівні відповідних значень контролю». Чому в контролі не змінювалася активність СОД за дії стресу? Стор. 98-99: «Однією з причин стрес-протекторної дії донора СО на проростки пшениці, ймовірно, є активація ферментативної антиоксидантної системи. Встановлено, що донор СО підвищував активність супероксиддисмутази, каталази та гваяколпероксидази у коренях проростків пшениці за звичайних умов і після ушкоджувального прогріву». Чи істотною була різниця за активністю СОД між контролем та варіантом з обробкою геміном (дані табл. 3)? Стор. 127. Чому вміст каротиноїдів вважається однаковим для значень 1.76 ± 0.07^a та 1.41 ± 0.03^a ? (Табл. 5.1). Як пов'язаний вплив ендогенного або екзогенного оксиду азоту з фотосинтезом за дії стресів? Що відомо про взаємодію газотрансмітерів з поліамінами, які теж беруть участь у передачі сигналів та регуляції стресостійкості? Чи впливає жасмонова кислота на акумуляцію фотосинтетичних пігментів?

Зауваження: Стор. 26. **«Практичне значення.** Дисертаційне дослідження розширює фундаментальні знання про механізми функціональної взаємодії між сигнальними посередниками-газотрансмітерами та окремими стресовими фітогормонами». На мою думку, це скоріше слід віднести до теоретичного, ніж до практичного. Не проставлено істотність різниці між варіантами: у табл. 3.1 (стор. 74) та на рис. 3.6-3.8 (стор. 83, 85, 86) рис. 4.3 -4.5 (стор. 104, 105, 108). У дисертаційній роботі зустрічаються термінологічні неточності, невдалі вирази, граматичні та стилістичні помилки: Стор. 82. «Так, викликане донором СО підвищення активності СОД, **катали** і гваяколпероксидази у коренях практично не проявлялося при їх обробці скавенджером пероксиду водню ДМТС (рис. 3.4)». *Каталази.* Стор. 125-126: «Пом'якшення донором сірководню викликаних сольовим стресом окиснювальних пошкоджень **листя** рослин Col-0 зменшувало екзоосмос електролітів з тканин **листя**, тобто сприяло збереженню цілісності мембран». *Листків.* Стор. 126: «Передобробка NaHS і НПН сприяла збереженню пулу хлорофілів **у листі**». *У листку.* «Вміст каротиноїдів у листках рослин трьох генотипів при помірному стресовому впливі достовірно не змінювався (табл. 5.1). Їх попередня обробка донорами сірководню і оксиду азоту істотно не впливала **на кількість** каротиноїдів (у табл. 5.1. представлено вміст, а не кількість фотосинтетичних пігментів). Стор. 127: Табл. 5.1 «(мг/г сухої маси) **в листі**». *У листку.* Стор. 130: «Незважаючи на важливість проліну як мультифункціонального протектора, менше підвищення його вмісту при

помірному сольовому впливі може вказувати на велику резистентність рослин (Кузнецов, Шевякова, 1999)». *Значну*. Стор. 136. «В той же час у рослин *jin1* при обробці донором СО відзначалося невелике, але **вірогідне при $P \leq 0,05$** підвищення активності СОД». Або «*статистично значиме при $p \leq 0,05$* », або «*вірогідне при $P \leq 0,95$* ».

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам, які пред'являють до наукового ступеня доктора філософії. Аналіз дисертаційної роботи М.А. Шкляревського показує, що вона є самостійним оригінальним дослідженням, виконаним на високому науковому та методичному рівні. Дана робота містить вирішення наукового завдання – вивчення ефектів функціональної взаємодії 3-х ключових газотрансмітерів (NO, H₂S, CO) між собою, з іншими сигнальними посередниками та окремими компонентами гормональної системи рослин у зв'язку з їх адаптацією до гіпертермії і сольового стресу.

Дана робота є завершеною працею, в якій отримані нові науково обґрунтовані результати щодо істотної ролі сигнальних молекул оксиду азоту, сірководню, монооксиду вуглецю та їх функціональної взаємодії з саліциловою і жасмоновою кислотами та брасиностероїдами при адаптації рослин до дії несприятливих абіотичних чинників.

Аналіз поданих до розгляду матеріалів та положень дисертаційної роботи М.А. Шкляревського «Функціональна взаємодія фітогормонів і газотрансмітерів при адаптації рослин до абіотичних стресорів», засвідчує, що за обсягом, науковою новизною, практичним значенням робота повністю відповідає вимогам "Тимчасового порядку присудження ступеня доктора філософії", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 167 від 06.03.2019 р., а її автор – Шкляревський Максим Анатолійович – заслуговує на присудження ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 "Біологія".

Офіційний опонент,
старший науковий співробітник
відділу фізіології та екології фотосинтезу
Інституту фізіології рослин і генетики
НАН України,
доктор біологічних наук

 Г.О. Прядкіна

