

ВІДГУК
офіційного опонента
на дисертаційну роботу ФЕЦЮХ Анастасії Богданівни
«ФІЗІОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ СТІЙКОСТІ РОСЛИН
***SALIX VIMINALIS* L. В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ»,**
подану на здобуття ступеня доктора філософії
зі спеціальності 091 – Біологія

Вивчення процесів адаптації рослин до зростання на техногенно забруднених субстратах є досить складною проблемою насамперед через одночасний вплив на рослинний організм комплексу різних і нерідко не повністю контрольованих чинників. Саме до таких об'єктів належать так звані хвостосховища, що утворюються в результаті видобутку та переробки полімінеральних руд. Поклади цих руд розташовані переважно у західних регіонах України. Так, у Дрогобицькому районі Львівської області функціонує велике Стебницьке родовище калійно-магнієвих солей. Внаслідок діяльності Стебницького калійного заводу утворилося хвостосховище з 22 млн т відходів. Розсол хвостосховища, що містить не лише солі калію, а й іони важких металів, засолює прилеглі землі та води і становить екологічну загрозу для районів виробництва та для басейну ріки Дністер. Цей об'єкт є переконливим прикладом актуальності проблеми розробки та вдосконалення підходів до рекультивації ґрунтів. Одним з ефективних її елементів може бути фіторе mediaція. Але вибір видів рослин, здатних до росту на забруднених ґрунтах, є складним завданням, що потребує спеціальних досліджень з використанням субстратів, відібраних конкретно на території, на якій плануються заходи з фіторе mediaції, а також польових досліджень безпосередньо на об'єкті. Водночас вирішення таких суто прикладних завдань за умов коректної постановки експериментів може дозволити отримати і нову інформацію про формування адаптивних реакцій рослин до комплексної дії стресових чинників, зокрема, засолення та важких металів. Зважаючи на це, дисертаційну роботу А.Б. Фецюх, присвячену фізіологічним аспектам адаптації верби прутовидної до чинників техногенного забруднення та оцінці її фіторе mediaційного потенціалу, можна вважати актуальною.

Основу дисертаційної роботи складають результати досліджень впливу субстрату з хвостосховища м. Стебника на ріст та стрес-протекторні системи рослин *Salix viminalis* L. Також у роботі досліджено угруповання ендofітних бактерій коренів *S. viminalis* за впливу ризосферних бактерій *Salicornia*

europaeae L., які розглядаються дисертанткою як один з прийомів, що може сприяти адаптації рослин до токсикантів.

Конкретні завдання роботи в основному відповідають її меті, вони полягали не лише у дослідженні росту рослин, функціонування їх антиоксидантної та інших стрес-протекторних систем, а й в аналізі вмісту важких металів у рослинному матеріалі і субстраті хвостосховища та оцінці його відповідності екологічним нормативам.

Дослідження виконувалися в рамках теми кафедри фізіології та екології рослин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка – «Використання енергетичних рослин для фітореMediaції техноземів» (№ держреєстрації 0117U000893) та на кафедрі мікології лісу та патології рослин факультету природних ресурсів і сільськогосподарських наук Шведського університету сільськогосподарських наук (Упсала, Швеція) в рамках двох проєктів за підтримки Шведського інституту (Svenska Institutet).

Дисертаційна робота написана українською мовою і викладена на 182 сторінках. Вона має традиційну структуру і складається зі вступу, огляду літератури, опису експериментальних об'єктів і методів досліджень, опису результатів та їх обговорення, що розділено на 13 підрозділів, узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, додатку з переліком власних публікацій.

У першому підрозділі огляду літератури наводиться характеристика територій Прикарпаття, техногенно забруднених внаслідок функціонування ДГХП «Полімінерал» та розглядаються шляхи їх відновлення. Дисертантка на основі узагальнення даних літератури наводить класифікацію фітореMediaційних механізмів, виділяючи фітоекстракцію, ризофільтрацію, фітостабілізацію, фітоволаталізацію, біореMediaцію. Окремо виділено процеси відновлення субстратів з використанням ризобактерій: біотрансформацію, біосорбцію та біоаккумуляцію. Вони знижують токсичність важких металів та їх транспорт до рослин. Наголошується, що використання ризобактерій для ремедіації є дешевою та ефективною технологією, яку можна використовувати на забрудненій ділянці разом з іншими підходами. У наступному підрозділі наводиться детальна характеристика верби прутувидної (*Salix viminalis* L.) як виду енергетичних рослин та оцінюється її фітореMediaційний потенціал на основні наявних даних літератури. Третій підрозділ огляду стосується власне механізмів адаптації рослин до абіотичних стресорів. Описано механізми виникнення окиснювального стресу, зумовленого передусім закриванням продихів внаслідок водного дефіциту, що виникає за умов росту рослин на засолених

грунтах. Наводиться дуже коротка характеристика антиоксидантної системи та окремі приклади її активації за дії засолення та посухи. Окремо окреслюються процеси поглинання важких металів рослинами і наводяться можливі молекулярні мішені їх дії. Як важливий механізм знешкодження важких металів розглядається синтез металотіонеїнів – низькомолекулярних білків, що зв'язують важкі метали. Крім того, наводяться дані про участь низькомолекулярних сполук (пролін та інші вільні амінокислоти, цукри, поліаміни тощо) у захисних процесах.

В останньому підрозділі огляду літератури розглядається роль мікробіому в адаптації рослин до стресових умов. Відзначається, що бактерії взаємодіють із корневими виділеннями та ґрунтовими мікробними угрупованнями, формуючи стійкі асоціації з рослинами. При цьому бактерії зазвичай здатні стимулювати ріст рослин у природній екосистемі і відіграють ключову роль в їх захисті від стресових чинників, зокрема, впливу високих концентрацій важких металів та засолення. За дії цих факторів формуються стійкі рослинно-мікробні асоціації для спільного виживання обох партнерів. Окремо розглядається цікавий механізм впливу асоційованих бактерій на ріст і стійкість рослин, опосередкований модуляцією синтезу етилену. На підставі викладеного в огляді літератури дисертантка робить висновки про доцільність вивчення фізіологічних механізмів захисту рослин конкретно для видів, що мають фіторедмедіаційний потенціал. Також обґрунтовується важливість скринінгу ендофітних бактерій коренів дослідних рослин в умовах техногенного забруднення.

У розділі 2 описано умови, матеріали та методи досліджень. Зокрема, наводиться коротка ботаніко-екологічна характеристика прутувидної верби, описується методика відбору субстрату з хвостосховища м. Стебник та аналізу його хімічних показників, у т. ч. вмісту важких металів. Також наведено дизайн лабораторних експериментів, методику оцінки ростових характеристик рослин, вмісту у них важких металів, аналізу біохімічних показників, у т. ч. білків, компонентів антиоксидантної та осмопротекторної систем. В окремих підрозділах характеризується методика виділення бактерій з поверхні коренів, отримання мікробної ДНК рослин та подальшого її секвенування, аналізу бактеріальної деамінази 1-аміноциклопропан-1-карбонової кислоти. У заключному підрозділі наводяться дані про повторення експериментів та статистичне опрацювання результатів.

У першому підрозділі розділу 3 (експериментального) наведено дані про вплив техногенного забруднення на морфометричні показники *S. viminalis*. Інформативним є використання автором показника флуктуаційної асиметрії листків, що є простим і недорогим біоіндикатором,

який може слугувати додатковим свідченням впливу стресора на морфологію. Показано пригнічення ростових параметрів *S. viminalis* за росту на субстраті Стебницького хвостосховища. Також встановлено, що площа листової пластинки у дослідному варіанті була меншою порівняно з контролем як у лабораторних, так і у польових умовах.

У двох наступних підрозділах експериментального розділу наводяться результати визначення вмісту водорозчинних солей, важких металів у субстраті та їх акумуляції в органах *S. viminalis*. Дисертанткою зроблено висновки, що збільшення вмісту важких металів у субстраті призводить до підвищення їх концентрації у рослинах. Найбільшу їхню кількість акумулювали стебла дослідних рослин. У зв'язку із цим, на думку автора, надземна частина рослина може використовуватись як біопаливо. У субстраті виявлено перевищення ГДК кадмію, заліза та стронцію. Показано також, що за росту рослин у субстраті дослідних варіантів відбувалося зниження показників вмісту важких металів, що напевно зумовлене їх поглинанням рослинами.

Підрозділи 3.5 та 3.6 присвячені скринінгу ендоефітних бактерій *S. viminalis* в умовах Стебницького хвостосховища та визначенню АСС-поглинаючих ендоефітних бактерій коренів *S. viminalis* за умов вирощування на техногенному субстраті. Дослідження впливу техногенного забруднення хвостосховища, а також сумісної дії удобрення ризосферою *S. europaеа* дали змогу оцінити негативний вплив забруднення на склад та біорізноманітність ендоефітних бактерій *S. viminalis*. Виявлено позитивний вплив ризосфери *S. europaеа* на кількість унікальних таксономічних одиниць порівняно із зразками рослин, які вирощувалися на субстраті хвостосховища без додавання ризосфери *S. europaеа*. Також за умов інокуляції нативними ризосферними бактеріями *S. europaеа* ризосферного шару рослин верби у дослідних варіантах виявлено більшу кількість бактерій-поглиначів АСС, що проявляється у зменшенні концентрації АСС. За оцінкою дисертантки, ці результати демонструють потенціал ендоефітних бактерій коренів *S. viminalis* у пом'якшенні впливу техногенного забруднення на рослини.

У підрозділі 3.7 наведено дані з визначення вмісту білків в органах контрольних і дослідних рослин, а також електрофоретичного спектра низькомолекулярних стресових білків.

У підрозділі 3.8 показано, що дія абіотичного стресу в умовах хвостосховища зумовлює прояв окиснювального стресу у рослин *S. viminalis*, що виявляється у накопиченні продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

У підрозділах 3.9, 3.10 та 3.11 наводяться результати дослідження функціонування антиоксидантної системи верби прутовидної за дії

техногенного забруднення субстрату. Показано, зокрема, підвищення активності каталази і пероксидази у стеблах 30-ти і 120-добових рослин за стресових умов. Також встановлено, що в стеблах рослин за впливу сольового навантаження відбувалося інтенсивне використання аскорбінової кислоти як антиоксиданту, зниження вмісту інших антиоксидантів – фенольних сполук – за стресових умов зафіксовано в усіх органах рослин.

У двох останніх підрозділах експериментальної частини аналізується вплив техногенного забруднення на вміст поліфункціональних низькомолекулярних протекторів – цукрів і проліну – в органах *S. viminalis*. Констатується зростання вмісту спирто- та водорозчинних цукрів у листках та коренях *S. viminalis*, за умов росту на Стебницькому хвостосховищі. Істотне зростання вмісту проліну за стресових умов відзначалося лише у стеблах рослин.

У розділі 4 узагальнено отримані результати. Слід відзначити наочну і досить інформативну схему полікомпонентного впливу техногенного забруднення на фізіологічні і біохімічні показники рослин *S. viminalis*, що зазнають впливу субстрату Стебницького хвостосховища (рис. 4.1). Згідно зі схемою, комплексний вплив стресорів (високі концентрації сульфатів, хлоридів, а також катіонів цинку, свинцю, кадмію та інших важких металів) призводить до зменшення біомаси рослин, збільшення асиметрії листків, посилення пероксидного окиснення ліпідів і водночас до активації антиоксидантних ферментів, накопичення осмолітів, посилення синтезу низькомолекулярних стресових білків.

Ще один важливий результат отриманий дисертанткою з використанням методики секвенування NGS: виявлено наявність відносно багатой ендofітної спільноти коренів *S. viminalis*, визначеної як кількість ідентифікованих операційних таксономічних одиниць (ОТО). Моделювання показало, що кількість ОТО зменшувалася на ділянках хвостосховища. Водночас у варіантах з впливом нативних ризосферних бактерій *S. europaea* виявлено зниження цього негативного ефекту. Також встановлено зменшення концентрації попередника етилену АСС у зразках коренів *S. viminalis* за сумісного впливу нативних ризосферних бактерій *S. europaea* та техногенного забруднення хвостосховища, що свідчить про протекторний вплив асоційованих бактерій на рослини. Можна цілком погодитися з тезою автора щодо доцільності подальшого дослідження взаємодії рослин і мікробіому в умовах техногенного забруднення для покращення ремедіаційних властивостей *S. viminalis*.

Отже, дослідження дисертантки розширюють знання про механізми адаптації енергетичних рослин до умов техногенного забруднення та

вказують на можливість використання рослин *S. viminalis* з метою ремедіації. Водночас вивчення складу ендofітних бактерій коренів досліджуваних рослин показали наявність таксонів, представники яких відіграють важливу роль у стійкості рослин до засолення та впливу важких металів. Це є передумовою для використання представників даних родів як інокулянтів для підвищення стійкості рослин, що використовуються для ремедіації.

Разом з тим, до дисертаційної роботи є низка зауважень:

1. Дизайн експериментів описано неповно. Зокрема, неясно, який саме субстрат для вирощування рослин використовувався в контрольних варіантах у лабораторних і польових дослідях. На с. 47 зазначається: «для контролю обрано місця відновленого біогеоценозу», у чому полягало відновлення не ясно. Також варто було б хоча б узагальнено вказати у розділі 2, чим принципово відрізнялися контрольні і дослідні варіанти, дані про хімічний склад субстратів наводяться, але вони розпорошені у різних таблицях дисертації, що ускладнює сприйняття. Є й інші незрозумілі моменти в організації польового дослідження: чи проводився він протягом одного року, чи повторювався в різні роки, в які саме роки? Не зайвим було хоча б згадати погодні умови в період проведення експериментів. Також не описано, як саме додавали у відповідні варіанти нативні ризосферні бактерії *S. europaea*.

2. Умови лабораторного експерименту також описано неповно, зокрема, не вказані світловий (освітленість, довжина дня) та температурний режими вирощування рослин.

3. Не обґрунтовано, чому саме відбір зразків рослин для аналізу в польових дослідях проводили на 120-у добу, а в лабораторних на 30-у? І, головне, не ясно, чи достатньо *одноразового* відбору проб для оцінки таких динамічних показників, як активність антиоксидантних ферментів, вміст низькомолекулярних антиоксидантів, осмолітів, стресових білків? Ці показники на різних фазах адаптації рослин до росту в стресових умовах можуть змінюватися. Крім того, вони залежать від фази розвитку рослин, а у дослідних рослин ріст помітно пригнічувався.

4. До вибраних для досліджень показників функціонування антиоксидантної системи не потрапили супероксиддисмутаза (ключовий антиоксидантний фермент, єдиний ензим, що знешкоджує радикальну АФК – супероксидний аніон-радикал), а також вміст відновленого й окисненого глутатіону – важливий показник, що характеризує окиснювально-відновну рівновагу.

5. Викликають сумнів величини вмісту білка в органах 30-ти добових рослин *S. viminalis*, вони становлять лише 1-2 мг/г сирової речовини. Виникає питання про повноту вилучення білків або ж про коректність розрахунків. В

опису методики немає посилань на вибрані умови екстрагування білків. Не виключено, що вилучення білків з наважки ацетоном з подальшим розчиненням у фосфатному буфері було недостатнім для виявлення повного вмісту білків. Якщо ж завдання полягало у вилученні певної групи білків, це необхідно було відзначити і обґрунтувати вибраний спосіб.

6. Дуже суперечливе враження справляють результати дослідження електрофоретичного спектра низькомолекулярних білків *S. viminalis* (с. 107). Низька якість електрофореграми, чорно-біле зображення змушують уважно читати розділ з описаними методами. А там в п. 2.10 (с. 55) взагалі пишеться про «Хроматографічне розділення низькомолекулярних білків». При цьому з опису неможливо зрозуміти, яким методом проводився аналіз, тому що про розділення білків після нанесення зразків на 12% поліакриламідний гель жодного слова! Посилання наприкінці тексту наведено на дуже старе джерело (Павлинова, 1971) і незрозуміло, якої саме частини методики воно стосується – екстракції, розділення, забарвлення чи всього аналізу? Не додає ясності і стаття дисертантки, в якій опубліковано цю частину результатів досліджень (Фецюх А.Б. та ін. Фізіологія рослин і генетика. 2020. Т. 52, № 5. С. 412-421), там взагалі не названий метод розділення білків, а методика «описана» так: «Вміст білка в пробі визначали за калібрувальним графіком, вміст низькомолекулярних білків — за методикою Павлинової [12] із додаванням буфера Лемлі, який містив меркаптоетанол...». Можна лише припускати, що використовувався все ж електрофорез в ПААГ. Зважаючи на такі серйозні методичні огріхи, твердженню про те, що «Вперше встановлено наявність низькомолекулярних стресових білків (8 – 30 кДа) у органах *S. viminalis* та показано їх участь у адаптаційних процесах *S. viminalis* до стресових умов Стебницького хвостосховища за лабораторних умов вирощування» (с. 24), яке автор постулює як «наукову новизну», довіряти дуже важко.

7. У роботі низка невдалих або помилкових тверджень, зокрема, «Фенольні сполуки, що містять *гідроксильний іон...*» (с. 114); «В залежності від виду рослин та від місцевості, на якій вони зростають, *біологічна активність* фенольних речовин є різна» (с. 114). А скільки фактичних помилок можна знайти у реченні «Біохімічні реакції синтезу вітаміну *корелюють* з *вуглеводневим* обміном, оскільки головні шляхи біосинтезу АК [аскорбінової кислоти] відбуваються внаслідок перетворення *вуглеводнів*, особливо глюкози і галактози, які є головними продуктами фотосинтезу».

8. Дисертантка дуже некритично підходить до вибору джерел для цитування. Третину списку складають джерела кирилицею, серед них багато статей в провінційних журналах і збірниках, підручники, практикуми,

методичні вказівки, є навіть посилання на бакалаврську (!) дипломну роботу (джерело під № 93), до того ж з неповним бібліографічним описом.

9. У роботі трапляються технічні огріхи, відсутня уніфікована система оформлення рисунків.

Попри вказані недоліки, більша частина представлених у роботі результатів має певне наукове значення. Це дозволяє вважати роботу такою, що відповідає середньому вітчизняному рівню досліджень в галузі експериментальної біології рослин.

За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей, одна з яких у зарубіжному журналі, що індексується у базі Scopus, та 14 тез.

Аналіз тексту дисертації свідчить про відсутність порушень автором вимог академічної доброчесності. Використані ідеї і результати інших авторів мають посилання на відповідне джерело, дотримано вимоги норм законодавства про авторське право. У роботі не виявлено явних ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації. Анотація відображає основний зміст дисертаційної роботи. Вона не містить положень чи ідей, що не наведені в основному тексті.

Таким чином, дисертаційна робота ФЕЦЮХ Анастасії Богданівни на тему «Фізіологічні аспекти стійкості рослин *Salix viminalis* L. в умовах техногенного забруднення» є завершеним самостійним дослідженням, яке за обсягом, новизною і практичним значенням відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, а її авторка, ФЕЦЮХ Анастасія Богданівна, заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 Біологія.

Офіційний опонент

доктор біологічних наук, професор,
завідувач лабораторії біохімії рослин
Інституту рослинництва імені Ю.Я. Юр'єва
НААН України

Ю.Є. Колупаєв