

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Игнатенко Анны Анатольевны «Участие антиоксидантной системы в регуляции холодоустойчивости растений пшеницы и огурца салициловой кислотой и метилжасмонатом», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Актуальность темы диссертации А.А. Игнатенко определяется тем, что гипотермия относится к числу наиболее распространенных негативных факторов внешней среды, который существенно ограничивает рост и продуктивность растений, как в России, так и во многих регионах мира, что сказывается в снижении урожая и его качества.

Диссертация построена по стандартному принципу и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, полученные результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, а также список сокращений и приложение.

Во введении дана общая характеристика работы, сформулированы цель и задачи работы, обоснована актуальность проведенной работы, представлены основные результаты, выносимые на защиту, аргументированы научная новизна и практическая значимость полученных результатов, кратко описаны методы исследования, степень достоверности результатов, сведения об их апробации, аргументированы положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» проведен анализ имеющихся на сегодняшний день сведений о вкладе про-/антиоксидантной систем в формирование устойчивости растений в ответ на широкий спектр абиотических и биотических стрессов, обсуждены физиолого-биохимические и молекулярные механизмы действия салициловой (СК) и жасмоновой (ЖаК) кислот и их производных в регуляции устойчивости растений и проанализированы сведения в литературе о совместном воздействии салицилатов и жасмонатов на растения. Обзор информативный, все его части связаны с темой диссертации и способствуют пониманию значения полученных результатов, а также свидетельствует о заинтересованности автора в исследовании выбранного направления физиологии и биохимии растений.

"Объекты и методы исследований" детально описаны в главе 2. Объектами служили проростки озимой пшеницы сорта Московская 39 (*Triticum aestivum* L.) и огурца (*Cucumis sativus* L.) гибрида F1 Зозуля. Проростки пшеницы выращивали в ходе 7 сут в рулонах фильтровальной бумаги на растворе Кнопа в климатикамере при температуре 2°C, относительной влажности 60–70%, освещенности ФАР 180 мкмоль/м²·с и фотопериоде 14 ч, после чего растения подвергали обработке 100 мкМ салициловой кислотой (СК) или 1 мкМ метилжасмонатом (МеЖ), а затем в этих же условиях - воздействию низких положительных температур. Контролями служили необработанные гормонами растения в оптимальных условиях произрастания. Растения пшеницы подвергали воздействию низкой закаливающей температуры 4°C в течение 7 сут, а таковые огурца – низкой закаливающей (12°C) и повреждающей (4°C) температуры в ходе 3 сут. Изучение морфо-физиологических, биохимических и молекулярно-биологических показателей проводили на первом листе проростков пшеницы и семядольных листьях огурца. Раздел основательный, демонстрирует использование широкого спектра методов, адекватных решению поставленных цели и задач, благодаря чему автор получила принципиально новые сведения.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» состоит из трех разделов. Первый из них посвящен анализу ответных реакций обоих видов растений на гипотермию разной интенсивности и продолжительности. в котором обсуждены полученные данные о холодоустойчивости растений пшеницы и огурца, о чем автор судила по ростовым параметрам побега и корня, накоплению биомассы, оводненности побегов, содержанию пероксида водорода и малонового диальдегида (МДА), а также активности антиоксидантных ферментов и содержанию пролина.

Температура 4°C оказала на растения пшеницы перманентный закаливающий эффект, начиная с 1-го ч и в ходе воздействия этой температуры устойчивость к холоду прогрессивно повышалась с максимумом на 7 сут, а в ответ на воздействие 12°C - спустя сутки. Об устойчивости растений огурца к гипотермии автор судила по выходу электролитов из тканей листьев, а также коэффициенту повреждения клеток, который на фоне воздействия 12°C не выявил существенных сдвигов показателей, а при температуре 4°C экзоосмос электролитов существенно возрастал. В листьях пшеницы в ответ на 4°C обнаружено накопление H₂O₂ и МДА, хотя к концу закаливания их содержание в клетках растений снижалось. Воздействие 12°C на семядольные листья огурца вызвало увеличение уровня этих же показателей, а продолжительное действие температуры 4°C - к их накоплению, вследствие прогресса окислительного стресса в их клетках. Далее был исследован вклад антиоксидантных ферментов в устойчивость пшеницы и огурца к гипотермии, что справедливо, поскольку им отводится ключевая роль в защите организмов от стресс-индуцированного накопления АФК. Так, температура 4°C через 1 ч вызвала активацию супероксиддисмутазы (СОД) в листьях пшеницы в ходе 7-ми сут опытов и прогрессивное накопление транскриптов генов *TaFeSOD* и *TaMnSOD* в ходе закаливания, выявлена высокая положительная корреляция между активностью фермента, содержанием транскриптов генов *TaFeSOD* и уровнем холодоустойчивости, при этом уровень мРНК гена *TaFeSOD* при гипотермии был выше у такого *TaMnSOD*, что указывает на разный вклад кодируемых этими генами изоформ фермента в общую активность СОД. В листьях огурца в зависимости от интенсивности и продолжительности стресса обнаружен другой ответ активности СОД: при 12°C активность СОД повышалась в ходе всего опыта с максимумом на 3-е сут, а при 4°C - в ходе первых 5 ч, вследствие высокого уровня продукции супероксид аниона, а в последующем - резкий спад активности фермента. В ходе охлаждения при 12°C в листьях огурца наблюдалось накопление транскриптов генов, кодирующих *CsCu/ZnSOD* и *CsMnSOD* изоформы СОД, при температуре 4°C уровень транскриптов гена *CsCu/ZnSOD* практически не изменялся, а в случае *CsMnSOD* - выявлено их снижение, что и привело к падению активности СОД. Анализ активности каталазы в листьях пшеницы в ответ на температуру 4°C выявил стимуляцию фермента в ходе первых 2 сут стресса, после чего - спад активности, при этом падение уровня транскриптов гена *TaCAT* пшеницы наблюдалось лишь на 7-е сут, а активность фермента - спустя 3-е сут. Активация каталазы и экспрессия кодирующего ее гена выявлена и в листьях огурца при температурах 12 и 4°C, при этом конститутивная активность каталазы огурца оказалась выше относительно пшеницы: кроме того, выявлен вклад гваякол-зависимой пероксидазы (ГвПО) в холодоустойчивость пшеницы и растений огурца. Кроме того, автором проведен анализ вклада пролина в реализацию холодоустойчивости обоих видов, что важно, поскольку он сочетает в себе свойства осмопротектанта, шаперона и антиоксиданта. В ответ на 4°C в листьях пшеницы наблюдалось поступательное накопление пролина и транскриптов генов *TaP5CS* и *TaP5CR*, кодирующих ферменты его синтеза. В растениях огурца также выявлено существенное накопление пролина.

К настоящему времени получено немало сведений об участии салициловой (СК) и жасмоновой кислот и их производных в индукции устойчивости растений к гипотермии, обусловленной способностью оказывать защитное действие на них, а именно, поддержание роста и фотосинтеза, снижение уровня окислительного стресса, укрепление целостности клеточных мембран и других. При этом сведения о роли СК и метилжасмоната (МеЖ) в регуляции холодоустойчивости растений ограничены, что и подвигло автора к изучению влияния этих гормонов на устойчивость к гипотермии проростков пшеницы и огурца.

Автором проведен отбор оптимальных в стимуляции холодоустойчивости растений пшеницы и огурца концентраций СК и МеЖ: для СК – 100 мкМ, а для МеЖ – 1 мкМ, которые индуцировали прирост холодоустойчивости обоих объектов. Полученные данные демонстрируют эффективность применения СК и МеЖ в поддержании роста растений пшеницы и огурца при гипотермии. Далее диссертант исследовала воздействие СК и метилжасмоната на уровень окислительного стресса и работу антиоксидантной системы у пшеницы и огурца при гипотермии. Так, влияние СК и МеЖ на общую активность СОД в листьях обоих видов в условиях гипотермии выявило их способность к активации фермента до действия низких температур, а в условиях холодной закалки - активность СОД была существенно выше, чем у необработанных гормонами проростков. Выявлено, что МеЖ усиливал экспрессию генов *TaFeSOD* и *TaMnSOD* в ходе всего эксперимента, а в листьях огурца предобработанных СК и МеЖ активность СОД и уровень транскриптов генов *CsCu/ZnSOD* и *CsMnSOD* оказались выше относительно необработанных гормонами растений при закалывающей и повреждающей температурах. Обнаружено, что в оптимальных условиях СК и МеЖ стимулируют активность каталазы и накопление транскриптов генов каталазы в листьях пшеницы и огурца, *TaCAT* и *CsCAT*, соответственно, при этом оба гормона стимулируют активность фермента, а также уровень транскрипции генов, кодирующих каталазу пшеницы и огурца, однако наиболее существенные сдвиги в этих показателях наблюдались в варианте опытов с предобработкой МеЖ в норме и при стрессе. Выявлено, что сама обработка СК и МеЖ вызывала активацию ГвПО в листьях пшеницы и огурца при 22°C, тогда как в условиях гипотермии предобработанные гормонами растения отличались повышенной активностью фермента, особенно, в варианте предобработки СК.

Гипотермия вызывает обезвоживание растений, поэтому неудивительно, что диссертант выявила накопление пролина и усиление экспрессии генов *TaP5CS* и *TaP5CR*, кодирующих ферменты его синтеза в растениях пшеницы, тогда как предобработка СК и МеЖ повысила уровень транскриптов обоих генов. Кроме того, увеличился уровень транскрипта гена *WCS120* дегидрина в растениях пшеницы.

Новизна диссертации определена тем, что в ней впервые проведен комплексный анализ вклада антиоксидантной системы в регуляцию холодоустойчивости растений пшеницы и огурца салицилатом и метилжасмонатом. Особо следует отметить, что представленные в диссертации результаты получены автором на различающихся по уровню холодоустойчивости видов растений, что отличает полученные данные в сравнении с другими исследованиями.

Значимость. Полученные в работе результаты отличаются новизной и актуальностью и могут быть использованы в научно-исследовательских институтах, таких как Казанский институт биохимии и биофизики Казанского НЦ РАН, Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Институт биологии – Коми НЦ УрО РАН и в ряде других научных организаций.

Заключение. В диссертационной работе А.А. Игнатенко четко сформулированы цель и задачи исследования. Для решения поставленных задач использован широкий спектр современных и классических методов физиологии и биохимии, адекватных решению поставленных задач. Этапы работы четко спланированы и полностью обоснованы, выводы корректно сформулированы, логически вытекают из полученных результатов и полностью обоснованы. Основные результаты опубликованы в семи статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ Министерства образования и науки РФ. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Диссертационная работа А.А. Игнатенко по всем критериям удовлетворяет требованиям «Положения о порядке присуждения постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г.», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений, а ее автор – Игнатенко А.А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Заведующая лабораторией молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессам Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и генетики УФИЦ РАН

д.б.н, профессор

Шакирова Фарида Миннихановна

Подпись Ф.М. Шакировой заверяю:
Зам. директора ИБГ УФИЦ, д.б.н.

 Карунас А.С.

Почтовый адрес: 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71

Телефон: (347) 235-60-88

e-mail: shakirova@anrb.ru

