

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Галибиной Наталии Алексеевны «Эндогенные механизмы регуляции ксилогенеза у древесных растений на примере двух форм березы повислой» представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 - «Физиология и биохимия растений»

Актуальность темы

Диссертация Наталии Алексеевны посвящена исследованию уникального явления - узорчатости древесины карельской березы. Формирование аномальной по строению и биохимическому составу древесины карельской березы привлекает внимание исследователей очень давно. И это связано с ее большой потребительской ценностью. В то же время ареал распространения карельской березы очень невелик и не понятны причины этого. С целью выяснения механизмов формирования узорчатости древесины карельской березы диссертант впервые изучил это явление на уровне как метаболизма, так и участвующих в этом ферментов и экспрессии кодирующих их генов.

Автор обоснованно базируется на концепции, что сахароза, как основная транспортная форма ассимилятов, играет у березы повислой ключевую роль в росте и развитии ксилогенеза в том или ином направлении. Поэтому, предваряя в диссертации собственные исследования, автор сделал обстоятельный обзор литературы не только по отклонениям от нормы формирования древесины карельской березы, но и факторов транскрипции, определяющих различную дифференцировку камбия, развивающегося в разных направлениях. Главный акцент сделан на двух ферментах распада сахарозы - сахарозосинтазе и апопластной инвертазе. Уделено большое внимание и пост-транскрипционной регуляции этих ферментов.

Обоснованность научных положений и выводов

Для убеждения читателя в обоснованности проведенных исследований автор подробно охарактеризовал свои объекты исследований. Основными объектами исследований были две формы березы повислой: обычная береза и карельская береза. Все опытные растения выращивались в одинаковых почвенно-климатических условиях.

Исследования проводились в самые разные фазы онтогенетического развития и на деревьях разного возраста, в том числе на молодых, которые еще не имеют визуальных отличий по структуре древесины. Следует отметить всю сложность анализа данного объекта исследования. Используются самые разные подходы для выявления эндогенных механизмов формирования узорной древесины. В подавляющем числе опытов для

исследований использовались ткани камбиальной зоны, как со стороны древесины, так и со стороны флоэмы. Такой подход требует очень большой внимательности и аккуратности при исполнении.

Все это позволило автору продемонстрировать очень яркие различия между этими формами берез по активности изучаемых ферментов. Процесс формирования древесины у обеих форм березы исследовался в разные фазы деревьев и этапы функционирования их камбия. Основные методы биохимического анализа отдельных метаболитов, активности ферментов и уровня экспрессии генов вполне современны и адекватны поставленным задачам.

В диссертации представлены данные многолетнего и большого объема экспериментальной работы (71 рисунок и 7 таблиц). На всех иллюстрациях каждый показатель представлен для обоих типов берез (простой и карельской). Проведена математическая обработка данных, что делает их достоверными и убедительными.

Направленность метаболизации сахарозы в тканях флоэмы и ксилемы непосредственно примыкающих к камбию оценивалась по активности соответствующих ферментов (сахарозасинтазы или инвертазы). Показано, что у карельской березы в период камбиального роста активность сахарозосинтазы в 2,5 раза ниже, чем у обычной березы. Наоборот, активность инвертазы была в 2,5 раза выше. И это основное отличие прослеживается у растений разного возраста.

Все основные положения работы представлены в многочисленных публикациях, в том числе в зарубежных журналах (2) и из списка ВАК (19). Материалы диссертации были доложены на многих (15) конференциях разного уровня.

Показано, что формирование аномальной древесины у карельской березы происходит на фоне низкой активности сахарозосинтазы в ксилеме, что сопровождается и снижением синтеза целлюлозы древесины. Но при этом возрастает количество крахмала. Все эти изменения подтверждены и обоснованы молекулярно-генетическими механизмами регуляции. Проведенные исследования позволили сделать заключение, что в период камбиального роста активность сахаросинтазы в зоне формирования ксилемы коррелирует с уровнем мРНК генов *Sus 1* и *Sus 2*, которые тканеспецифичны для ксилемы. А это значит, что существует соответствующая обратная метаболитная связь, приводящая к тому или иному пути дальнейшего развития метаболизма.

Диссертантом исследована у разных форм березы также и активность инвертазы (как симпластной, так и апопластной). Обнаружено повышенное число форм моносахаров у карельской березы по сравнению с обычной. Повышенное число форм и может быть тем поворотным пунктом изменения направленности метаболизма. Этот

раздел особо интересен. Контрастные изменения соотношений активности разных форм инвертазы (АпИнва:ВАКИнва:ЦитИнва) наглядно показывают, что апопластная инвертаза в наибольшей степени реагирует на экзогенную сахарозу, а цитозольная в наименьшей степени. Из этого автор делает заключение о важной роли осмотических градиентов между этими компартментами. Возможно, что эта регуляция осуществляется путем контроля именно осмотических градиентов, которые могут изменять на соответствующих мембранах давление в определенную сторону. Именно изменение этого давления и может быть тем механизмом переноса через мембраны необходимых регуляторов в нужный компартмент.

В диссертации представлены результаты оригинальных опытов с нарушением эндогенного транспорта сахарозы по стволу березы в нисходящем направлении путем кольцевания. Наибольшее количество во флоэме транскриптов мРНК гена *СWIN1* по сравнению с контролем (без кольцевания) было обнаружено непосредственно выше кольца, где происходило максимальное накопление сахарозы. Возможно, это и есть попытка растения восстановить поврежденную флоэму.

Интересно, что количество транскриптов мРНК гена *СWIN1* в зоне под нижним кольцом не отличалось от контроля. Это позволяет предполагать достаточно большой запас сахарозы в проводящей системе нижней части ствола и корней. Следовательно, процессы, использующие там сахарозу, насыщены по субстрату. Сходные изменения во флоэме произошли и с экспрессией гена, кодирующего сахарозосинтазу. При этом количество транскриптов в ксилеме было сходным с контролем.

Интересные данные были получены диссертантом по уровню экспрессии генов, кодирующих транспортеры гексоз. Оно возрастало у окольцованных растений во флоэме во всех исследуемых зонах. При этом избыток сахарозы, образовавшихся при кольцевании растений, приводящий к возрастанию концентрации сахарозы и уровня экспрессии генов, кодирующих АпИнва, не сопровождался увеличением гексозных транспортеров.

Для более прямого доказательства роли сахарозы в формировании узорчатой древесины в диссертации проведены и опыты с экзогенной сахарозой различных концентраций. Диссертант отдает себе отчет, что используемые в опыте концентрации сахарозы малы по сравнению с эндогенной во флоэме. А в этом случае экзогенный раствор, вероятно, притягивает сахарозу из флоэмы, снижая в ней концентрацию.

В то же время, резкое снижение синтеза ксилемы начиная с 5%-го уровня концентрации экзогенной сахарозы может свидетельствовать регуляторной функции этого порога. Возможно, это связано с большим расстоянием точки опыта (нижняя треть ствола) до донорных листьев, где концентрация сахарозы конечно выше. И сама

активность апопластного фермента возрастает со снижением концентрации сахарозы во флоэме.

С этим же, по-видимому, связано и развитием аномалий достаточно далеко от листьев-доноров сахарозы. Кроме того, действие довольно пониженных концентраций сахарозы может быть связано и с более трудным ее выходом из флоэмы, что деревьям свойственно, так как они вынуждены поднимать воду на большую высоту. А снижение осмотичности флоэмной жидкости уменьшает сосущую силу корней.

Это означает, что у карельской березы сама проницаемость мембран флоэмы ниже, чем у обычной. Если это так, то у карельской березы должен быть меньший выход сахарозы из флоэмы в апопласт в стебле и, соответственно, пониженный ее восходящий транспорт в молодые побеги. Это должно отражаться на понижении роста годовых побегов на ветвях. Действительно, в разделе 6.2.2. (рис. 68) показано, что при высоком уровне НРКбезузорчатые березы почти в два раза выше карельских. Со снижением уровня доступного минерального питания это различие снижается.

Таким образом, представленные в диссертации результаты исследований содержат большой потенциал для дальнейшего решения проблемы карельской березы. Много подготовлено диссертантом и для направленного формирования структуры древесины карельской березы с заданными свойствами, а также расширения ареала ее распространения. Этого уже давно ждут от биологов лесоводы. А это позволяет сделать вывод о том, что диссертация Н.А. Галибиной имеет большое не только фундаментальное, но и прикладное значение. Можно ожидать в ближайшем времени новых диссертаций, но уже прикладного значения.

Заключение

Диссертация Наталии Алексеевны Галибиной является вполне завершенной научно-квалификационной работой, которая соответствует требованиям докторского уровня. Проведенные автором исследования выявили молекулярно-генетические закономерности развития разных сценариев ксилогенеза древесных растений. Представленные в ней экспериментальные данные о формирования узорчатой древесины карельской березывносят весомый вклад в понимании механизма данного уникального явления.

Установлена роль азотного питания, которое подавляя загрузку сахарозы во флоэму, снижает ее метаболизацию в процессе формирования древесины, что и отражается на специфике узорчатой древесины. Показано, что не смотря на отсутствие узорчатости

древесины у молодых растений карельской березы, тем не менее, они также отличаются «от обычной березы распределением экспрессии генов, контролирующих развития камбия.

Все вышесказанное позволяет заключить, что диссертационная работа Наталии Алексеевны Галибиной соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г № 842. Автореферат полно и правильно отражает содержание диссертации. В целом работа соответствует критериям, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ему степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 - физиология и биохимия растений.

Зав. лабораторией продукционных процессов растений
Казанского института биохимии и биофизики
КИББ ФИЦ КазНЦ РАН,
д.б.н., профессор



В.И. Чиков



Подпись Чикова В.И. завершено.
Ст. демонстратором: Лаз (Ламбаев В.И.)