

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Галибиной Натальи Алексеевны: «Эндогенные механизмы регуляции ксилогенеза у древесных растений на примере двух форм березы повислой», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Ускорение роста и улучшение свойств древесины – основные задачи современной лесной биотехнологии. Ключевую роль в повышении продуктивности лесов играет ксилогенез – процесс формирования древесины (ксилемы), включающий в себя образование структурных элементов ксилемы и отличающихся между собой по составу компонентов их клеточных стенок. Поиск путей эффективного управления ксилогенезом актуален с точки зрения повышения продуктивности растений, а также - получения древесины с заданными свойствами. В этой связи Карельская береза представляет собой уникальный объект исследования для познания механизмов морфогенеза древесных растений, поскольку для древесины характерен широкий спектр разнообразия структурных элементов.

Оригинальная текстура древесины карельской березы формируется в результате отклонений в деятельности латеральной меристемы – камбия, деятельность которого осуществляется за счет притока из фотосинтезирующих листьев сахарозы – основной транспортной формы сахаров у березы повислой. Утилизация сахарозы в акцепторных тканях происходит при участии ферментов ее гидролиза – инвертазы и сахарозосинтазы. При этом, однако, участие ферментов метаболизации сахарозы в процессах ксилогенеза остается слабо изученным и диссертант предполагает их участие в дифференциации производных камбия. Не останавливаясь на рассмотрении физиолого-биохимических показателей автор рассматривает молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе регуляции деятельности меристем. Как правило, в литературе рассматриваются функции транскрипционных факторов применительно к развитию первичных проводящих тканей ствола и не затрагивают формирование вторичных проводящих тканей.

В этой связи изучение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических закономерностей деятельности камбия на примере карельской березы актуально не только с точки зрения поиска путей эффективного управления ксилогенезом, но является необходимым для познания механизмов деления, роста и дифференцировки клеток камбиальной зоны древесных растений. Важное значение имеет получение знаний о биохимических путях, ключевых ферментах ксилогенеза, и их регуляции на молекулярном уровне. Поэтому актуальность данного диссертационного исследования не вызывает сомнения.

Целью диссертационной работы явилось изучение эндогенных механизмов роста и дифференцировки камбиальных производных у двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины.

Диссертационная работа написана и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, и состоит из введения, обзора литературы, методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 287 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц и 71 рисунок. Основные положения диссертации опубликованы более чем в 80 работах, в том числе 25 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК, среди них 9 статей в журналах из списков Scopus и Web of Science, один патент, одна база данных.

Обзор литературы Автором с использованием большого числа отечественных и иностранных публикаций, рассмотрены отклонения от нормы в камбиальной зоне, происходящие при формировании аномальной древесины карельской березы. Показаны пути регуляции деятельности камбия у древесных растений, рассмотрены факторы транскрипции, обуславливающие дифференцировку камбиальных производных по тому или иному пути. Обсуждены основные функции сахарозосинтазы и апопластной инвертазы в камбиальной зоне древесных растений, показаны возможные пути регуляции их активности. Рассмотрена роль азотных соединений в регуляции ксилогенеза древесных растений.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследований. Следует здесь отметить проведение исследований на растениях обычной березы повислой – *Betula pendula* Roth var. *pendula* и карельской березы – *B. pendula* var. *carelica* различного возраста и использования в работе участков древесины с разной степенью узорчатости.

Для изучения влияния разных концентраций сахарозы на развитие тканей проведен эксперимент с введением в ткани ствола деревьев растворов сахарозы разной концентрации. Для изучения камбиального роста в условиях различной обеспеченности тканей ассимилятами нарушали нисходящий транспорт сахарозы путем кольцевания стволов деревьев. Приводятся методики проведения микроскопических исследований, биохимических исследований и определение уровня экспрессии генов. Полученные результаты обрабатывались статистически и оценивалась значимость различий средних величин по t-критерию Стьюдента.

Глава 3. Биохимические индикаторы разных сценариев ксилогенеза

В работе детально рассматривается годовая динамика содержания сахарозы и активность ферментов ее метаболизации в тканях ствола двух форм березы повислой, различающихся по структуре древесины, участие апопластной инвертазы и сахарозосинтазы в поддержании аттрагирующей способности камбиальной зоны. При формировании узорчатой древесины карельской березы имеет место смена приоритетного направления утилизации сахаров в клетках ксилемы. Процессы, связанные с синтезом/распадом сахарозы и крахмала, начинают преобладать над синтезом структурных компонентов вторичных клеточных

стенок. Приводятся результаты показывающие отличие путей метаболизации сахарозы в камбиальной зоне при формировании древесины с разной степенью узорчатости, содержание сахаров и соотношение активности ферментов утилизации сахарозы у сеянцев двух форм березы повислой.

Глава 4. Молекулярно-генетические механизмы регуляции разных сценариев ксилогенеза. Без сомнения сильной стороной диссертационной работы является исследование молекулярно-генетических механизмов регуляции разных сценариев ксилогенеза. Автором приводятся результаты по регуляции активности сахарозосинтазы на уровне экспрессии кодирующих ее генов в период камбиального роста. Активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2*, *Sus3* в развивающейся ксилеме 10-летних растений двух форм березы повислой, активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов *Sus1*, *Sus2* в развивающейся ксилеме 25-летних растений карельской березы с разной степенью узорчатости древесины, активность сахарозосинтазы и уровень экспрессии генов *Sus1* и *Sus2* у сеянцев обычной березы повислой и карельской березы.

В работе проведено изучение активности гексокиназы и уровня экспрессии генов, кодирующих переносчики сахаров, с точки зрения их потенциального участия в глюкозном сигналинге в клетке, а также рассматривается регуляция активности апопластной инвертазы на транскрипционном и посттрансляционном уровнях в период камбиального роста.

Глава 5. Основные регуляторы развития ствольных клеток камбиальной зоны

Развитие сосудистой системы растений во многом связаны с изменением экспрессии генов, кодирующих CLE-пептиды группы В (CLE-41) и их рецептор (TDR), в период камбиального роста. Автором проводятся данные характеризующие распределение экспрессии генов, кодирующих факторы транскрипции VND6, VND7 и APL, в камбиальной зоне при разных сценариях ксилогенеза и изменение уровня экспрессии генов *CLE41* и *PXY* у сеянцев обычной березы повислой и карельской березы на начальных этапах онтогенеза. Формирование нормальной по строению древесины обычной березы, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне экспрессии во флоэме гена *CLE41* и в камбиальной зоне – гена *PXY*. Формирование аномальной узорчатой древесины карельской березы, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы и нарушение ориентации проводящих элементов, происходит на фоне (1) существенного увеличения уровня экспрессии гена *CLE41* во флоэме и гена *PXY* в камбиальной зоне и (2) эктопической экспрессии *CLE41* в ксилеме.

При образовании нормальной по строению древесины у обычной березы и безузорчатой карельской березы уровень экспрессии генов *VND6* и *VND7* в ксилеме был выше, по сравнению с узорчатыми растениями карельской березы. У обычной березы в ксилеме выше количество транскриптов мРНК гена *VND7* в 2 раза, по сравнению с безузорчатыми растениями, и в 10 раз, по сравнению с узорчатыми растениями.

Важным моментом в диссертационной работе является анализ влияние уровня плодородия почвы на реализацию генетической программы у карельской березы (глава 6).

Показано, что избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы. Доступность подвижного азота в почве оказывает влияние на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы. Снижение плодородия почвы уменьшает метаболизацию сахарозы сахарозосинтазой при формировании нормальной по структуре древесины березы. Возрастание нитратредуктазной активности может увеличивать активность сахарозосинтазы. Снижение подвижного азота в почве увеличивает метаболизацию сахарозы по апопластному пути у узорчатых растений карельской березы. Возрастание нитратредуктазной активности отрицательно влияет на формирование узорчатой древесины у растений карельской березы.

Новизна научных результатов и выводов. В диссертационной работе впервые изучено распределение активности ферментов, метаболизирующих сахарозу (три формы инвертазы, сахарозосинтаза), в проводящих тканях и камбиальной зоне двух форм березы повислой (*Betula pendula* Roth) при разных сценариях ксилогенеза. На растениях разного возраста обычной березы повислой и карельской березы изучена регуляция активности сахарозосинтазы на уровне экспрессии кодирующих ее генов, рассмотрено участие фермента в синтезе целлюлозы и крахмала в период камбиального роста.

Впервые проведено изучение экспрессии генов, кодирующих апопластную инвертазу и ее белковый ингибитор, в процессе нормального и аномального ксилогенеза, рассмотрены возможные пути регуляции активности апопластной инвертазы у растений обычной березы и карельской березы с узорчатой и безузорчатой текстурой древесины.

Впервые при аномальном ксилогенезе изучено распределение экспрессии генов, определяющих направление дифференцировки производных камбия, изучен уровень экспрессии генов, которые кодируют транскрипционные факторы регулирующие синтез вторичной клеточной стенки, развитие и дифференцировку клеток ксилемы. Продемонстрирована возможность изменения экспрессии указанных генов при увеличении содержания сахарозы в проводящих тканях.

Практическая значимость работы. Впервые показано, что высокий уровень азотного питания подавляет активность ферментов метаболизации сахарозы, контролирующих формирование узорчатой древесины у карельской березы. Активность основных ферментов, утилизирующих сахарозу в камбиальной зоне, можно использовать в качестве биохимического индикатора разных сценариев ксилогенеза: (1) формирование древесины, в составе которой преобладают сосуды и волокна и (2) формирование древесины, для которой характерны крупные включения клеток паренхимы.

Предложены новые методические подходы к экспериментальной регуляции ксилогенеза древесных растений, что может быть использовано для эффективного управления этим процессом как с точки зрения увеличения выхода биомассы древесины, так и выращивания древесины с

заданными свойствами. Установлена зависимость между степенью насыщенности текстуры древесины карельской березы и уровнем доступного азота в почве. Установлен диапазон содержания азота, способствующий лучшему проявлению узорчатости древесины.

Диссертационная работа Галибиной Н.А. написана хорошим языком, представляет собой законченное, актуальное исследование, выполненное с использованием современных подходов и на высоком методическом уровне. Заключение и выводы, сделанные диссертантом, обоснованы и достоверны и имеют как теоретическую, так и практическую значимость. Основные положения диссертации опубликованы более чем в 80 работах, в том числе 25 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых ВАК, среди них 9 статей в журналах из списков Scopus и Web of Science, один патент, одна база данных. Основные результаты обсуждены на многочисленных отечественных и международных конференциях. Автореферат отражает содержание диссертационной работы. В диссертации представлены новые научные результаты, она четко структурирована, ее оформление соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук.

В целом, по актуальности проблемы, новизне и объему экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных результатов работа Галибиной Натальи Алексеевны, соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук (п. № 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013г.), а её автор – Галибина Наталья Алексеевна заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

Руководитель группы экологии
и физиологии фототрофных организмов
Института фундаментальных
проблем биологии РАН,
доктор биологических наук



А.А. Кособрюхов

142290 Россия, Московская обл., г. Пушкино, ул. Институтская, дом 2
Телефон: 8(4967)73-29-88, E-mail: kosobr@rambler.ru
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт фундаментальных
проблем биологии Российской академии наук

16.09. 2018

