

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Игнатенко Анны Анатольевны

на тему: «Участие антиоксидантной системы в регуляции холодоустойчивости растений пшеницы и огурца салициловой кислотой и метилжасмонатом», представленную на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Актуальность избранной темы. Исследования механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды являются приоритетными направлениями физиологии растений. Это вызвано тем, что потери урожая сельскохозяйственных культур от абиотических стрессов достигают огромных размеров. Наиболее губительными абиотическими стрессорами являются неблагоприятные температуры.

Низкие положительные (пониженные) температуры оказывают на растения неоднозначное действие – они могут, с одной стороны, выступать как абиотический стрессор (для теплолюбивых растений); с другой – формировать повышенную холодоустойчивость, т.е. участвовать в акклимации растений к температуре. Представленная диссертационная работа направлена на комплексное рассмотрение этих двух аспектов низкотемпературного воздействия на растения, относящиеся к разным экологическим группам, – теплолюбивое (огурец) и холодостойкое (пшеница). Обе культуры взяты для исследования не только потому, что имеют высокую ценность для аграрно-промышленного комплекса страны, но также потому, что это чувствительные культуры к неблагоприятным температурам, и исследования, проведенные на этих модельных объектах, достаточно характерны.

Одним из ключевых механизмов ответных реакций растений на действие пониженных температур является усиление генерации активированных форм кислорода (АФК) и изменение функционирования антиоксидантной системы (АОС). У разных видов растений эти изменения могут происходить с различной амплитудой, позволяя оценить реакцию объектов на неоптимальные температуры. Изменения в функционировании про- и антиоксидантной систем могут быть ассоциированы с действием фитогормонов. Если роль классических фитогормонов в низкотемпературных воздействиях на растения изучена довольно хорошо, то салициловая кислота (СК) и жасмоновая кислота (ЖК) – относительно новые объекты исследований физиологов растений, эффекты которых при действии стрессоров еще только изучаются.

Оценка возможности использовать экзогенные регуляторы роста (РР) СК и ЖК для повышения адаптивных способностей растений по отношению

к низким положительным температурам, как и выяснение механизмов таких эффектов, остается весьма актуальным вопросом.

Новизна полученных результатов и выводов. Автором проведен комплексный анализ реакции молодых растений огурца и пшеницы на действие закалывающих или повреждающих (огурец) пониженных температур. Впервые показано, что СК и ЖК (в форме метилжасмоната, МЖ) повышают холодоустойчивость изучаемых объектов. Выявлено, что защитные эффекты СК и МЖ связаны с повышением активности антиоксидантной системы, как ферментативной, так и низкомолекулярной. Получены новые данные об усилении экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазу (СОД) и каталазу), ферменты синтеза пролина, и дегидрин.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретически значимыми для углубления современных представлений об устойчивости растений к пониженным температурам являются результаты, доказывающие важную роль АОС и фитогормонов СК и ЖК в механизмах низкотемпературной адаптации. Полученные автором результаты свидетельствуют о возможности их использования для повышения стрессоустойчивости растений, особенно при разработке технологий выращивания растений в регионах с неблагоприятными климатическими (температурными) условиями. Сделанные диссертантом выводы могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторных занятий для студентов вузов биологических, экологических и сельскохозяйственных специальностей.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности результатов обусловлена большим объемом экспериментального материала. Достоверность полученных данных доказана результатами статистической обработки. Идея работы, а также выдвинутые в ней цель и задачи базируются на обобщении имеющихся в литературе сведений по обсуждаемой проблеме. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 21 научной конференции разного уровня.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа изложена на 191 странице. Структура диссертации стандартная, состоящая из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений. Список литературы включает 514 источников, из них 335 – на иностранных языках. Диссертация содержит 16 таблиц, 41 рисунок и 8 приложений.

В главе 1 Обзор литературы автор анализирует имеющиеся на сегодняшний день данные, касающиеся темы диссертационной работы. Детально рассмотрена роль антиоксидантной системы в реакциях растений на действие низких температур; при этом дана подробная характеристика основным АФК и обсуждается функционирование АОС в растениях. Обсуждаются синтез и

физиологическая роль салициловой и жасмоновой кислот в растениях, в том числе их антистрессовое действие. Большое внимание уделено рассмотрению участия экзогенных СК и МЖ в повышении холодоустойчивости теплолюбивых и холодостойких культур, потенциальные механизмы влияния СК и ЖК на физиологические процессы, включая функционирование антиоксидантной системы растений. Показано взаимодействие СК и ЖК в растениях. В целом литературный обзор освещает основные аспекты современных знаний по теме диссертации.

В главе 2 автор перечисляет объекты исследования и дает характеристику изученных видов и сортов, подробно описывает постановку экспериментов и методы исследований, перечисляет используемые методы статистической обработки полученных данных.

Глава 3 посвящена описанию и анализу полученных результатов исследования. В ней обсуждаются данные по реакции растений пшеницы и огурца на воздействия пониженных температур разной интенсивности и продолжительности (степень холодоустойчивости, изменения ростовых параметров, содержание пероксида водорода и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ), активность антиоксидантных ферментов, содержание пролина), как в отсутствие, так и вследствие обработки растений салициловой или жасмоновой кислотой перед низкотемпературным воздействием. Автор справедливо отмечает, что ответные реакции различающихся по холодоустойчивости видов имеют сходный качественный характер, включая торможение роста, усиление образования H_2O_2 и интенсивности ПОЛ, активацию ферментов антиоксидантной защиты и повышение уровня пролина, но отличаются в количественном выражении. В ходе исследований диссертанту удалось выявить выраженные межвидовые различия в ходе закаливания растений и формирования холодоустойчивости, а также сроки воздействия пониженных температур, когда проявлялось их повреждающее действие.

Существенно украшают работу доказательные данные по накоплению в ходе процесса закаливания транскриптов генов, кодирующих Fe-СОД, Mn-СОД, Cu/Zn-СОД (у разных объектов), что служит одним из механизмов повышения активности антиоксидантных ферментов. В то же время в растениях огурца при повреждающей температуре $4^{\circ}C$ уровень транскриптов генов, кодирующих СОД, не возрастал, что указывает на отсутствие синтеза новых молекул СОД. Сходные эффекты получены по транскриптам генов, кодирующих каталазу, в листьях пшеницы и огурца при закаливающих и повреждающих температурах. Содержание транскриптов генов, участвующих в синтезе пролина – низкомолекулярного антиоксиданта, также возрастало в листьях пшеницы в ходе низкотемпературной акклимации.

В следующем разделе главы 3 проанализировано влияние СК и МЖ на ответные реакции растений пшеницы и огурца на действие пониженных температур. Здесь автором помещены интересные материалы исследования холодоустойчивости растений в зависимости от концентраций экзогенно добавленных аналогов фитогормонов – СК и МЖ. Выявлены положительные эффекты РР при действии оптимальной и пониженной температуры, лучшие эффекты СК выражены при дозе 100 мкМ, МЖ – от 1 до 100 мкМ. В эксперименте автора подтвердилось, что ответная реакция растений на охлаждение может различаться в зависимости от концентрации РР, и в дальнейшем все исследования проводили при одной дозе – 100 мкМ СК и 1 мкМ МЖ. Убедительно показано, что у изученных видов предобработка СК и МЖ повышала устойчивость клеток к действию низких температур.

Автором получены интересные данные, отражающие межвидовые различия в ответной реакции растений на пониженные температуры вследствие предобработки аналогами фитогормонов. Это показано по различным параметрам роста, содержанию H_2O_2 и интенсивности ПОЛ, активности антиоксидантных ферментов и содержанию мРНК их генов, содержанию пролина и транскриптов генов, кодирующих ферменты его синтеза, а также содержанию мРНК дегидрина. Отмечено, что СК и МЖ способствовали повышению устойчивости при закалывающих температурах, и некоторому снижению негативного действия повреждающей температуры; по-видимому, протекторная роль СК и ЖК в условиях гипотермии связана с участием аналогов фитогормонов в регуляции работы АОС.

В Заключении автор обобщает полученные данные и выделяет основные, наиболее значимые результаты работы. Далее приводятся выводы, которые в большинстве отражают поставленные задачи.

В Приложении автором помещены табличные данные экспериментальных результатов, в той или иной мере (чаще графически) представленных в главе 3 диссертации.

Диссертация удачно и полно иллюстрирована, документирована рисунками, фотографиями, таблицами. В целом она тщательно выверена и отредактирована.

Замечания и вопросы по работе. К диссертации имеются некоторые замечания и вопросы.

1. В главе 1 явно не хватает раздела, в котором были бы проанализированы накопленные к настоящему моменту литературные данные по действию пониженных температур на холодостойкие и теплолюбивые растения, по низкотемпературной акклимации (закаливанию) и повреждению теплолюбивых растений.

2. Автор в научной новизне приводит уже хорошо известные данные о том, что «активизация работы АОС является общей реакцией растений... на действие низких положительных закаливающих... температур», а также «показано, что фитогормоны СК и МЖ повышают устойчивость [пшеницы и огурца] к низким температурам». Эти данные отражены как в обзоре литературы, так и при обсуждении полученных результатов.

3. При описании практической значимости работы указывается на возможность использования фитогормонов (СК и ЖК) для повышения стрессоустойчивости (холодоустойчивости) растений. Однако экспериментальная часть исследования была ограничена только 7 или 3 сутками (для пшеницы и огурца соответственно) действия пониженных температур, без анализа последствий охлаждения на растения. В то же время известно, что повышенная холодоустойчивость, индуцированная экзогенными воздействиями (например, температурными), сохраняется на протяжении ограниченного интервала времени. Возникает вопрос, насколько долгим будет эффект экзогенной обработки растений СК или МЖ на повышение холодоустойчивости растений огурца и пшеницы?

4. В главе 2, на мой взгляд, необходимо было более детально обосновать выбор температурных режимов для разных видов. Если для огурца были взяты две температуры – закаливающая (12°C) и повреждающая (4°C), что соответствует задачам исследования, то для пшеницы автор ограничилась одной лишь закаливающей температурой (4°C), без повреждающей. Это существенно сузило возможности сравнения реакции растений двух видов на гипотермию. К тому же механистическое сравнение реакции холодоустойчивого (пшеницы) и теплолюбивого (огурец) растений по степени изменений измеряемых параметров в ответ на охлаждение, на мой взгляд, несколько некорректно без адекватного соотношения температур. Возможно, автору следовало вести отсчет не от 0°C, а от биологического нуля (для каждого вида своего).

5. В этой же главе некорректно описана методика определения содержания H_2O_2 (не включающая источник Fe^{2+}). Также, на мой взгляд, недостаточно описана статистическая обработка данных, т.к. в таблицах и на графиках приведены буквенные обозначения для достоверно различающихся данных (расчеты, скорее всего, проводили по Duncan или Tuckey), но в описании для значимости различий между средними указаны лишь критерий Стьюдента и $НСР_{0,5}$, которые иначе обозначают достоверность различий между вариантами.

6. В главе 3 вызывает недоумение высокое содержание транскриптов генов, кодирующих белок СОД, на фоне резкого падения ее активности в вариантах с повреждающей температурой (когда растения фактически погибли,

судя по выходу электролитов, т.е. спустя 2 и 3 суток охлаждения при 4°C). Чем это можно объяснить?

7. Интерпретация действия СК и МЖ на растения пшеницы и огурца требует некоторого уточнения. Если бы, как полагает автор, СК и ЖК выступают как сигнальные молекулы, то их действие не зависело бы от концентрации, тогда как выявленные в работе эффекты отчетливо показывают, что экзогенно добавленные РР вызывали в растениях реакцию, аналогичную стрессовой, т.е. синтетические аналоги фитогормонов выступают своеобразными стрессорами для растений. Возможно, именно этим объясняется их активирующее действие на АОС растений.

8. Обнаруженные автором эффекты, что СК и МЖ способствуют поддержанию ростовых процессов растений пшеницы и огурца, подвергнутых действию пониженных температур, требуют объяснения, за счет чего это происходит. Возможно, следует принимать во внимание, что все фитогормоны образуют общую «сеть» в растении, и изменения активности одного компонента повлечет за собой активацию или ингибирование других компонентов этой системы.

Есть замечания, которые касаются оформления диссертации. На мой взгляд, подразделы главы 3 лучше бы оформить как отдельные главы, для более четкого представления результатов исследования. В табл. 2–6 и др. – лучше бы дать обозначение достоверных различий (*) между вариантами опыта, а не в динамике эксперимента; в табл. 9 и далее приведено двойное обозначение достоверных различий (* и буквами), без указаний, к чему они относятся; плюс некоторые варианты выделены полужирным шрифтом, тоже без указаний, что это означает. В табл. 1 автореферата приведены разнородные способы обозначения достоверных различий (* и буквами).

Отмечены неудачные выражения, например: «это указывает на необратимое повреждение клеточных мембран и снижение устойчивости растений» – стр. 10 автореферата (стр. 60 диссертации), когда из рис. видно, что проростки погибли; «СК и МЖ оказывают защитный эффект, снижая проницаемость мембран клеток...» – стр. 14 автореферата (стр. 89 диссертации); «гваякол-зависимая пероксидаза» (это не зависимость, а обозначение модельного субстрата при определении неспецифической активности пероксидазы), и другие.

Сделанные замечания, которые в основном носят рекомендательный характер, и выявленные недостатки, в том числе оформительского характера, не мешают сделать ниже следующее положительное заключение.

Заключение. Диссертация Игнатенко Анны Анатольевны является законченным научным исследованием. Работа выполнена и оформлена в соответствии с современными требованиями, диссертация и автореферат хорошо

иллюстрированы. Достоверность полученных результатов базируется на большом объеме проведенных экспериментов с использованием разнообразных методов исследования и подтверждена данными статистической обработки. Выводы отражают результаты исследования. Результаты диссертации доложены на конференциях и полностью отражены в 25 печатных работах, из которых 6 статей в журналах из перечня, рекомендованного ВАК РФ, и одна – в журнале из наукометрической базы данных Web of Science. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и соответствует положениям, выносимым на защиту.

В целом, по объему выполненного исследования, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа «Участие антиоксидантной системы в регуляции холодоустойчивости растений пшеницы и огурца салициловой кислотой и метилжасмонатом» полностью соответствует требованиям пунктов 9–14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г.; от 02.08.2016 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор – Игнатенко Анна Анатольевна – заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент,
заведующий кафедрой ботаники, физиологии и экологии растений
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»
доктор биологических наук (03.00.12 – Физиология и биохимия растений)
профессор

Лукаткин Александр Степанович

430005, Республика Мордовия, г. Саранск,
ул. Большевикская, дом 68
телефон: (8342)322507
факс: (8342)324554
E-mail: aslukatkin@yandex.ru

29 апреля 2019 г.

