

## Отзыв

официального оппонента на диссертацию Ниловой Ирины Александровны  
**«Устойчивость растений пшеницы к высокотемпературным  
воздействиям разной интенсивности: физиолого-биохимические и  
молекулярно-генетические аспекты»,**  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Несмотря на значительный объем накопленных экспериментальных данных в обсуждаемой проблеме, интерес исследователей к изучению особенностей и механизмов ответной реакции растений на действие высоких температур по-прежнему не ослабевает. Из многочисленных публикаций следует, что любые отклонения от экстремальных температур окружающей среды вызывают у растений широкий спектр физиолого-биохимических и молекулярно-генетических изменений, которые связаны или с их адаптацией к ним, или проявляют различные нарушения деструктивных процессов, приводящих к гибели растений.

Как показывает анализ литературы, приведенный автором диссертации, недостаточно изученными остаются многие особенности физиолого-биохимических и молекулярно-генетических процессов при высокотемпературных воздействиях разной интенсивности. Вместе с тем, многочисленные литературные сведения показывают, что характер изменений многих из них, может существенным образом изменяться в зависимости от напряженности неблагоприятного фактора, что, очевидно, имеет существенное значение в процессах формирования стресс-устойчивости растений.

**Цель работы** состояла в изучении ряда физиолого-биохимических и молекулярно-генетических реакций растений озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L., сорт Московская 39) на высокотемпературные воздействия разной интенсивности. Для достижения этой цели автором было поставлено 5 задач исследования (стр. 7 – 8 диссертации и стр. 4 автореферата).

**Структура работы.** Диссертационная работа построена традиционно, изложена на 163 страницах, содержит 26 рисунка, 10 таблиц, включает в себя 500 литературных источников, в том числе 384 на иностранном языке. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, обсуждения результатов, заключения и списка литературы.

## **Глава 1. Обзор литературы (стр. 13 -49).**

Анализ обзора литературных сведений, приведенных в этой главе, позволило автору диссертации прийти к заключению, что высокотемпературные воздействия как правило приводят к значительным изменениям всего метаболического цикла у всех культурных растений. Эти изменения являются как правило частью защитных реакций и существенным всего цикла их роста и развития. Однако по мнению диссертанта относительно небольшие повреждения клетки, связанные, например, с накоплением белков с нарушенной структурой и генерацией АФК, могут послужить причиной синтеза защитных белков (Iwata, Koizumi, 2012; Deng et al., 2013; Kørner et al., 2015; Wan, Jiang, 2016). Например, АФК влияют на уровень экспрессии генов, кодирующих стрессовые белки, в частности HSP, и ферменты АОС (Volkov et al., 2006), а также регулируют активность ТФ (Apel, Hirt, 2004; Davletova et al., 2005; Miller, Mittler, 2006; Kotak et al., 2007). Далее, согласно современным представлениям, стрессовые реакции затрагивают также отдельные части растительного организма, например, клетки и даже отдельные их компартменты. Так, неблагоприятные воздействия могут приводить к развитию ЭР-стресса, для которого характерно накопление белков с нарушенной структурой в полости ЭР, и ряд реакций направленных на устранение таких белков (Deng et al., 2013; Kørner et al., 2015). Разные авторы отмечают, что изменения в клетках растений в зависимости от интенсивности высокотемпературного воздействия, могут быть обратимыми и вызывать повышение устойчивости растений или быть необратимыми и приводить к их гибели (Balogh et al., 2013; Рихванов и др., 2014; Giri et al., 2017). Подобный подход предполагает, что слово «стресс» соответствует понятию «неблагоприятный фактор», который действует на растения с разной силой (Войников, 1987; Volat et al., 2014; Nguyen et al., 2015). Исходя из вышеприведённого обзора литературы, автор использует термины «мягкий», «средний» и «жесткий» стрессы (разная стрессовая нагрузка). При этом под «мягким» стрессе понимаются изменения, не носящие деструктивного характера и приводящие к активации только защитно-приспособительных реакций в связи с устойчивостью. Под «средним» стрессом подразумеваются изменения, которые наряду с защитно-приспособительными реакциями могут включать в себя какие-либо нарушения и/или повреждения, к которым растения могут адаптироваться. Устойчивость растений в таких условиях будет сохраняться на достаточно высоком уровне в течение относительно длительного времени; под «жестким» стрессом автор понимает глубокие

деструктивные изменения, с которыми защитно-приспособительные механизмы растений уже не справляются, и которые ведут к гибели растения. Попутно хочу отметить, **Глава 1** включает много научной информации, иногда не относящийся к обсуждаемой проблеме, этим она перегружена и сложночитаема.

## **Глава 2. Объект и методы исследования (стр. 50 - 58).**

Исследования проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39. Растения в течение 7 сут выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на модифицированном питательном растворе при температуре воздуха 22°C, его относительной влажности 60 – 70%, освещенности ФАР 180 мкмоль/(м<sup>2</sup>·с), с фотопериодом 14 ч. Затем проростки пшеницы подвергали температурным воздействиям разной интенсивности (опыт), от 29° до 45°C при сохранении прочих условий неизменными. Продолжительность высокотемпературного воздействия также варьировала – от 15 мин до 5 сут. В качестве контроля служили проростки, выращенные в оптимальных (22°C) температурных условиях.

Теплоустойчивость растений оценивали двумя способами а) после 5-минутного прогрева высечек из листа в водном термостате при последовательном повышении температуры с интервалом в 0,4°C (Александров, 1963). В качестве критерия устойчивости использовали температуру гибели 50% (ЛТ<sub>50</sub>) палисадных клеток листа, определяемую по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы; б) после воздействия температур 33°, 37° и 43°C в течение 1 – 3 сут и отрастания в нормальных условиях при температуре 22°C.

Оводненность листьев оценивали по Аринушкиной (1970).

Общую активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (Beauchamp, Fridovich, 1971).

Генерацию супероксид анион-радикала и содержание пероксида водорода оценивали качественным методом *in situ* путем восстановления нитросинего тетразолия с образованием фиолетового преципитата формазана методом, описанным Джабсом и др. (Jabs et al., 1996), и полимеризации 3,3-диаминобензидина при вступлении в контакт с пероксидом водорода в присутствие пероксидазы методом, описанным Тордал-Кристенсен и др. (Thordal-Christensen et al., 1997), соответственно.

Содержание малонового диальдегида (МДА) оценивали по накоплению продукта его реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим методом (Kumar, Knowles, 1993; Сибгатуллина и др., 2011).

Содержание белка определяли по методу Брэдфорда, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

Накопление транскриптов генов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени.

Фрагментацию ДНК оценивали с помощью электрофоретического метода. ДНК выделяли согласно методу, описанному в работе Мёллер и др. (Möller et al., 1992).

Повторность и статистическая обработка результатов проведена общепринятыми методами.

По **Главе 2** следует вопрос: чем определен выбор объекта исследования? Сорт Московская 39 является давно ушедшим из растениеводства. Не понятно почему выбрана озимая пшеница, казалось бы, в эксперименты необходимо было включить пшеницу яровую. Методики водообмена растений, к сожалению, не соответствует современным методам.

### **Глава 3. Результаты исследований и их обсуждения (стр. 58 - 106).**

Обсуждаемая глава содержит следующие разделы экспериментальной работы

#### ***3.1 Некоторые физиологические особенности реакций растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.***

##### *3.1.1. Теплоустойчивость клеток листьев (стр. 58 - 64)*

Эксперименты этого плана показали автору следующее: температуры 33° и 37°С не оказывают влияния на выживаемость растений пшеницы сорта Московская 39 и не вызывают видимых признаков их повреждения, в то время как температура 43°С (и выше) не только приводит к снижению теплоустойчивости клеток листьев, но и к повреждению растений, а через 3 сут воздействия – к их гибели.

##### *3.1.2. Рост и оводненность листьев (стр. 64-71)*

Опыты диссертанта показали, что при воздействии на растения высоких температур (+33°, +35° и +37°С) происходит торможение ростовых процессов уже начиная с 1-х сут эксперимента, последнее достоверно проиллюстрировано в табл 4 (стр. 65); температуры от +41 до +45°С приводили к полной остановке роста растений; далее при этих условиях

изменялись сырая и сухая биомассы, что связано с изменением в водообмене растений.

Следовательно, по мнению автора, с повышением теплоустойчивости растений, наблюдаемым под влиянием температур (33° – 39°C), возрастает степень ингибирования их роста, что, очевидно, связано с определенными изменениями в метаболизме растений, и прежде всего с торможением процессов, необходимых для активного роста и развития растений, и с активацией различных защитных механизмов. Автор справедливо считает, что из-за нарушения многих физиологических процессов, например, водного обмена и минерального питания (см. раздел 1.1), более высокие температуры (41° – 45°C) приводят к резкому снижению устойчивости растений, что является следствием развития деструктивных процессов. Представленные выше данные об устойчивости и выживаемости растений пшеницы, изменении ростовых показателей, оводненности тканей листа, а также анализ литературных данных позволили автору не только ранжировать изученные температуры относительно характера их действия на указанные признаки жизнедеятельности растений, но и подбирать температуры и условия экспериментов, позволяющие достоверно определять реакцию растений на стрессовые условия их жизнедеятельности.

### ***3.2. Некоторые биохимические особенности реакций растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности***

Раздел этой главы включает следующие этапы экспериментов

*3.2.1. Динамика активности в листьях супероксиддисмутазы (СОД) (стр. 71 - 73)*

*3.2.2. Образование в листьях супероксид анион-радикала (стр. 73 - 77)*

*3.2.3. Образование в листьях пероксида водорода (стр. 77 - 79)*

*3.2.4. Динамика содержания в листьях малонового диальдегида (МДА) (стр. 79 - 82)*

Резюмируя вышеизложенное, автор заключает, что направленность биохимических реакций существенным образом зависит от интенсивности высокотемпературного воздействия. Показано, что в условиях эксперимента температура 33°C - практически не влияла («мягкий» стресс), а более высокие температуры эксперимента (37°C «средний» стресс и 43°C «жесткий» стресс) приводили к активизации СОД и образованию МДА и АФК. Следовательно,

по мнению автора, с увеличением интенсивности высокотемпературного воздействия до определенного предела, с одной стороны, возрастает сопротивляемость растений, с другой - постепенно нарастают деструктивные процессы, и, как следствие приводит к повреждению клеток и тканей растения.

### ***3.3. Некоторые молекулярно-генетические особенности реакций растений озимой пшеницы на высокотемпературные воздействия разной интенсивности.***

Раздел содержит следующие подразделы

*3.3.1. Динамика содержания в листьях транскриптов генов HSP (стр. 82 - 95).*

Эксперименты этого плана показали, что динамика накопления транскриптов генов, кодирующих белки БТШ с высокомолекулярной массой (БТШ70 и БТШ90) схожа при температурах 33°C, 37°C, 43°C. По мнению автора, таких данных в литературе не обнаружено (последнее заслуживает внимания). Считаю необходимым отметить важный результат экспериментов этого плана: полагаю, что заключение автора по накоплению транскриптов генов, кодирующих белок BiP, по результатам проведенных экспериментов носит новизну и заслуживает высокой оценки.

*3.3.2. Динамика содержания в листьях транскриптов генов системы контроля качества белка (IRE1, BI-1) (стр. 95 - 101)*

*3.3.3. Динамика содержания в листьях транскриптов генов ВАХ.2, МСАII, кодирующих белки, участвующих в ПКГ (стр. 101 - 104)*

*3.3.4. Фрагментация ДНК в клетках листьев (стр. 104 - 106).*

Анализ экспериментов этого плана (разделы 3.3.2, 3.3.3 и 3.3.4) позволил автору их обобщить в следующем виде. Так, в зависимости от интенсивности и продолжительности температурного воздействия, реакции растений на температуру могут как активизироваться, так и ингибироваться, о чем свидетельствуют результаты проведенных автором экспериментов. Так, последнее выражается в накоплении транскриптов гена *IRE1* при температуре 37°C («средний» стресс) или снижаются при температуре 43°C («жесткий» стресс), на котором развиваются процессы ПКГ. По найденным И.А. Ниловой литературным сведениям, аналогичное было отмечено на животных клетках (Hollien et al., 2009) и на *Arabidopsis thaliana* L. (Mishiba et al., 2013).

**Глава 3.** Удивляет многочисленными экспериментами, с использованием современных методов исследования, а также умением их использовать.

### **Заключение**

Диссертационная работа И.А. Ниловой «Устойчивость растений пшеницы к высокотемпературным воздействиям разной интенсивности: физиолого-биохимические и молекулярно-генетические аспекты» и ее автореферат свидетельствуют о современном наукоёмком достоверном научном исследовании. Как я полагаю, это оправдывается тем научным базисом, который получила И.А. Нилова в крупной научной школе физиологов и биохимиков Карельского научного центра РАН, где проходила свое обучение в аспирантуре и начала свою научную деятельность.

При подробном анализе всей структуры и содержания обсуждаемой диссертационной работы, следует сделать общее заключение оппонента по диссертации (соответствующие замечания даны в каждой главе).

1. И.А. Нилова справедливо считает, что из-за нарушения многих физиологических процессов, например, водного обмена и минерального питания, более высокие температуры (41° – 45°С) приводят к резкому снижению устойчивости растений, что является следствием развития деструктивных процессов.

2. Автор убедительно показывает, что направленность биохимических реакций существенным образом зависит от интенсивности высокотемпературного воздействия на растения: в условиях эксперимента температура 33°С - практически не влияла («мягкий» стресс), а более высокие температуры эксперимента (37°С «средний» стресс и 43°С «жесткий» стресс) приводили к активизации СОД и образованию МДА и АФК.

3. И.А. Нилова экспериментально впервые показывает, что динамика накопления транскриптов генов, кодирующих белки БТШ с высокомолекулярной массой (БТШ70 и БТШ90) схожа при температурах 33°С, 37°С, 43°С. Заключение автора по накоплению транскриптов генов, кодирующих белок ВiР, полученное в результате проведенных экспериментов, носит новизну и заслуживает высокой оценки.

4. К высокой оценке диссертационной работы И.А. Ниловой следует отнести вывод о зависимости активности генов *IRE1*, *BAX.2*, *MCAII* от интенсивности высокотемпературного воздействия.

Давая оценку экспериментальной работе и сделанным по ней выводам, считаем, что диссертация И.А. Ниловой «Устойчивость растений пшеницы к высокотемпературным воздействиям разной интенсивности: физиолого-биохимические и молекулярно-генетические аспекты» является законченным исследованием. Диссертация написана хорошим научным языком, довольно легко читается, стилистические ошибки встречаются редко. Достоверность полученных результатов обоснована. Автореферат соответствует содержанию

диссертации, а список публикаций автора довольно полно отражен в научных публикациях различного ранга.

Диссертационная работа соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», принятого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г, а ее автор, Нилова Ирина Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

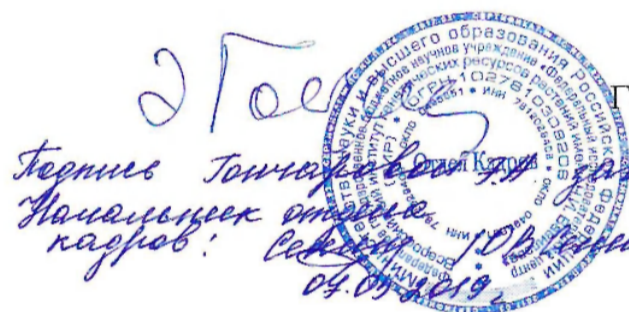
Официальный оппонент,

главный научный эксперт,

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР)

доктор биологических наук (03.01.05. – Физиология и биохимия растений)

профессор

Гончарова Эльза Андреевна  
*Эльза*  
*Эльза Андреевна Гончарова*  
*Наименее опытный*  
*кадров: Сектор*  
*04.05.2019*

190000, Российская Федерация г.Санкт-Петербург,

ул.Б.Морская д.42, 44,

телефон: 8 (812) 314-22-34

E-mail: e.goncharova@vir.nw.ru

07 мая 2019 г.