

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Мурган Ольги Константиновны, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений, на тему: «Сравнительное исследование физиологических механизмов защитного действия 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона у растений картофеля при солевом стрессе»

Актуальность темы диссертационной работы

Засоление является одним из наиболее губительных абиотических факторов внешней среды, который отрицательно сказывается на росте и развитии растений, ухудшает многие их свойства и функции. Так, растения испытывают разнообразные морфофизиологические и биохимические изменения из-за осмотического стресса, что в свою очередь приводит к повреждению мембран, дисбалансу питательных веществ, падению эффективности фотосинтеза, инактивации ферментов, нарушению продукции первичных и вторичных метаболитов, что в итоге приводит к снижению их продуктивности и сельскохозяйственной ценности.

Повышенный осмотический потенциал почвенного раствора в настоящее время – один из лимитирующих факторов, распространенный на очень больших территориях как в нашей стране, так и во всем мире. Известно, что наиболее вредное влияние оказывают ионы Na^+ и Cl^- . Под влиянием натрий-хлоридного засоления происходит нарушение ультраструктуры клеток, в частности, структурной организации хлоропластов и других мембранных структур; избыточные концентрации натрия препятствуют накоплению других ионов, таких как калий и кальций.

Все это определяет необходимость изучения механизмов повреждающего действия засоления и способов повышения солеустойчивости растений, поэтому работа Ольги Константиновны Мурган является актуальной.

Диссертационная работа Ольги Константиновны Мурган посвящена изучению физиологических механизмов защитного действия 24-эпибрассинолида (ЭБЛ) и 24-эпикастастерона (ЭПК) у растений картофеля при солевом стрессе. Известно, что минерализация среды влияет на физиологическую динамику фотосинтеза, Фотосистема I (ФС I) и Фотосистема II (ФС II) образуют большую часть АФК в хлоропласте при стрессе, которые вызывают окислительное повреждение белков, нуклеиновых кислот и липидов. Также накопление пролина является обычной адаптивной реакцией на различные абиотические стрессы. Логично, что происходят изменения в экспрессии генов, связанных со стрессом. Все эти физиологические, биохимические и молекулярные аспекты глубоко исследованы Ольгой Константиновной не просто при солевом стрессе, но и под воздействием ЭБЛ и ЭПК у растений картофеля.

Солевой стресс напрямую влияет на развитие и урожайность растений, в связи с чем особую актуальность представляет изучение механизмов адаптации к стрессу или преодоления его губительного влияния за счет изменения в данном случае гормонального баланса. Такие исследования важны как с

фундаментальной точки зрения, так и с практической. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, изложения полученных результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 157 страницах машинописного текста и включают 50 рисунков и 37 таблиц. Список цитируемой литературы включает 101 источник, из которых 84 – на иностранном языке.

После краткого введения, в котором определены актуальность, новизна, теоретическая и практическая значимость, цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Эта глава включает 3 раздела.

Обзор литературы каждого из разделов охватывает широкий круг вопросов, а именно: (1) в первом разделе разбираются аспекты засоления как экологического фактора окружающей среды; (2) во втором разделе проанализированы литературные данные по физиологическому ответу растений на действие засоления; (3) в третьем разделе рассматривается роль brassinosterоидов (БС) в формировании защитных механизмов растений при солевом стрессе.

В целом, обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Ольга Константиновна Мурган при написании обзора литературы, использует не только научные результаты зарубежных коллег, но и хорошо знает и цитирует научные публикации отечественных исследователей. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал современных методов, применяемых в мировой практике биохимических, физиологических и молекулярных исследований растений. Следует отметить корректность и адекватность избранных для работы методов и, в ряде случаев, их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

В качестве объекта исследования были использованы оздоровленные растения-регенеранты семейства Solanaceae – *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской.

Аналитическое рассмотрение данных, представленных в разделе "Результаты", позволяет заключить следующее: соискателем была осуществлена серия экспериментов, в целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Диссертация выполнена на высоком научном уровне, основные положения работы сформулированы убедительно и аргументировано, раскрыты всесторонне с огромным количеством полученных результатов.

Глава «Результаты» включает три раздела. Первоначальные исследования соискателя связаны с анализом эндогенного содержания различных групп фитостероидов и влиянием 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона на физиологические процессы растений картофеля в культуре *in vitro* и *in vivo*. Ольга Константиновна Мурган начинает свое исследование с определения эндогенного содержания различных групп БС в растениях картофеля. Результаты проведенного исследования показали, что в корнях растений уровень всех исследуемых групп БС был выше, чем в побегах. Исходя из полученных данных о том, что суммарное содержание лактон- и кетонсодержащих БС в целых микроклонах, полученных из боковых почек, было сходным, автор абсолютно справедливо решает, проводить дальнейшие исследования с использованием экзогенных гормонов на растениях, полученных из боковой почки.

В ходе дальнейшего исследования воздействия БС на растения при отсутствии стресса было показано, что длительное присутствие БС в питательной среде замедляло рост как надземной, так и подземной частей растения. Но после перемещения растений на неагаризованную безгормональную питательную среду почти все ростовые показатели растений восстанавливались до контрольных значений. В то время как кратковременное воздействие БС *in vivo* приводило к стимуляции роста надземной части растений картофеля. Ростовые показатели (длина побега и корня, число листьев, число столонов) зависели от варианта БС (ЭПК или ЭБЛ), их концентраций и длительности обработки. Так длительное воздействие БС в меньшей степени влияло на ростовые показатели, однако вызывало более существенные изменения в физиологических характеристиках растений картофеля (на общую сырую массу и на содержание воды в разных частях растения картофеля; содержание фотосинтетических пигментов, пролина и величину осмотического потенциала; содержание неорганических ионов). При отсутствии стресса ЭБЛ регулировал осмотический статус растений за счёт органических и неорганических осмолитов при длительном воздействии, и оба БС, только за счёт накопления пролина – при кратковременном воздействии. Воздействие длительной обработки растений картофеля в культуре *in vitro* ЭБЛ и ЭПК влияло на содержание пигментов, функционирование фотосистемы II и другие физиологические параметры (содержание фотосинтетических пигментов, содержание пролина, ТБК-АП и неорганических ионов, а также величину осмотического потенциала). Все эти данные очень хорошо для понимания автор диссертации обобщает в заключительном Рисунке 19. Хочется отметить, что такие обобщающие рисунки-схемы сделаны автором к каждой главе «Результатов», что очень облегчает восприятие материала диссертации.

Дальнейшие усилия соискателя были направлены на изучение влияния БС при действии солевого стресса. Во второй главе «Результатов» Ольга Константиновна Мурган показала, что воздействие хлоридного засоления (75-200 мМ) отрицательно сказалось на растениях картофеля. Наблюдалось опадение листьев, снижение величины осмотического потенциала и увеличение содержания пролина, снижение интенсивности роста и значений сырой массы растений, а также повышение ПОЛ. И при высоких концентрациях хлорида натрия (150 или 200 мМ) через сутки воздействия снижалось содержание

фотосинтетических пигментов и повышалась активность гваяколзависимой пероксидазы.

При экзогенном воздействии БС (глава 3 «Результатов») показана органоспецифичность их защитного действия при последующем засолении. Все предобработки БС в той или иной степени способствовали снижению негативного эффекта хлоридного засоления. БС способствовали сохранению воды в тканях растений в условиях действия хлорида натрия, за счет накопления осмопротекторов, таких как пролин или неорганические одновалентные ионы; восстанавливали длину побега до контрольных значений, способствовали сохранению роста корня.

Отдельный цикл экспериментов был направлен на исследование вклада воздействия БС, разной химической структуры (24- эпибрассинолид (ЭБЛ) и 24-эпикастастерон (ЭПК)). Показана зависимость их воздействия от длительности обработки и концентрации. Длительное воздействие ЭБЛ (10 нМ) в большей степени, чем ЭПК, защищало рост побегов при солевом стрессе. ЭБЛ понижал интенсивность ПОЛ, стимулировал активность антиоксидантных ферментов и активировал накопление пролина. ЭПК (10 нМ) сохранял оводненность тканей, поддерживал уровни фотосинтетических пигментов, активность ФС II (75 мМ NaCl) и экспрессию гена *CHS1a*. С другой стороны, кратковременное воздействие ЭПК стимулировало накопление сухой биомассы, повышало уровни хлорофилла а и каротиноидов, тогда как 20 ЭБЛ увеличивало оводненность тканей. Оба БС стимулируют активность антиоксидантных ферментов.

В главе «Результаты» автор также уделяет внимание влиянию обработки растений картофеля ЭБЛ и ЭПК на экспрессию генов биосинтеза БС (*CYP 450 90A1*, *CYP 450 85A1*, *CYP 450 90B1* и *DET2*) в зависимости от продолжительности гормональной обработки. В этих экспериментах автор диссертации применяет для обработки ЭБЛ и ЭПК в самой высокой из исследуемых концентраций (1000 нМ), что, на мой взгляд, оправдано.

Также интересные результаты получены при изучении действия хлоридного засоления на уровень транскриптов стресс-протекторных генов растений картофеля (*P5CS1*, *P5CR*, *PDH*, *CHS1*, *PAL*, *APX1*, *APX3*) во времени и при обработке растений ЭБЛ и ЭПК, в также последующего засоления. Также, было оценено накопление транскриптов генов, кодирующих белки натриево-протонных антипортеров (*SOS1* и *NHXs*). Ольга Константиновна Мурган показала, что при длительном воздействии ЭБЛ и при последующем хлоридном засолении поддерживался высокий уровень экспрессии гена *CHS1a*, в то время как ЭПК стимулировал накопление транскриптов гена *NHX3*. Кратковременное воздействие гормона, напротив, снижало уровень транскриптов *NHX3* гена в ответ на действие ЭПК и значительно повышало уровень экспрессии гена *APX3*.

Ольгой Константиновной Мурган получен огромный массив данных, которые ей удалось удачно изложить, проанализировать. Положения и выводы, выносимые на защиту сформулированы убедительно и аргументировано, раскрыты всесторонне, глубоко с анализом различных точек зрения, формулированием собственной позиции и являются результатом самостоятельной исследовательской деятельности автора. А рекомендации и

предложения исследования имеют четко выраженную практическую направленность.

Степень новизны результатов научных исследований

Ольгой Константиновной Мурган получены приоритетные данные о закономерностях ответных реакций растений картофеля на засоление хлоридом натрия в широком диапазоне концентраций (50-200 мМ). Так, соискателем на основе анализа полученных экспериментальных данных установлено, что растения отвечали на засоление торможением роста, дефолиацией; повышением интенсивности ПОЛ, падением осмотического потенциала клеток листа и накоплением пролина; снижением уровня пигментов и увеличением активности пероксидазы; ингибированием фотохимической эффективности ФС II; подавлением экспрессии генов антиоксидантных ферментов и гена *CHS1a*; одновременно происходило увеличение уровней транскриптов генов-транспортеров ионов *SOS1*, *NHX2* и *NHX3*. Все данные рассматривались в динамике и в зависимости от концентрации NaCl.

Приоритетными можно назвать также результаты о влиянии разных по структуре БС (лактон- и кетон-БС в концентрации 10 или 1000 нМ) в условиях солевого стресса и без него. Автором диссертации впервые охарактеризованы ростовые реакции растений картофеля в зависимости от химической структуры, концентрации и продолжительности действия БС. Показано, что лактонсодержащий БС более активен, чем его кетонсодержащий аналог. Впервые показано протекторное действие ЭБЛ на рост побега, и ЭПК на сохранение сырой массы при последующем хлоридном засолении.

Ольга Константиновна Мурган на основе большого фактического материала показала, что влияние разных по структуре БС на морфофизиологические характеристики сохраняется через 19 суток после прекращения воздействия фитогормонов. Было впервые определено эндогенное содержание БС в микроклонах растений картофеля и показано, что суммарное количество лактон- и кетонсодержащих БС в целых микроклонах, полученных из боковых почек, сходно.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Ольги Константиновны Мурган совмещает в себе фундаментальность и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о механизмах ответной реакции растений на солевой стресс. С практической точки данная работа интересна тем, что полученные данные могут быть востребованы при решении вопросов повышения устойчивости культурных растений к неблагоприятным факторам внешней среды, а также при выведении новых высокопродуктивных линий сельскохозяйственных культур и разработке акклимационных моделей взаимодействия природы и растительного мира.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических физиологических, биохимических и современных молекулярно-биологических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и

достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Ольги Константиновны Мурган, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Ольги Константиновны Мурган опубликованы в 8 статьях, входящих в базу цитирования ВАК, Scopus и /или Web of Science, и 17 – в РИНЦ. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возник ряд вопросов:

1. Соискатель использует 10 или 1000 нМ концентрации БС. На чем основан выбор именно этих концентраций, различающихся на несколько порядков?

2. Почему использовали внесение БС в среду для культивирования? Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работы Ольги Константиновны Мурган имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя:

- В некоторых местах «Литературного обзора» не хватает ссылок на источники (стр. 19, 23).

- В тексте главы «Результаты» автор постоянно использует названия первый, второй и третий этапы эксперимента, но на Рисунках-схемах 4-10 это не отображено.

- На Рисунке 11 показано схематичное изображение родительского микроклона растений картофеля без корней.

- На Рисунке 22 отсутствует контроль.

- Обобщающие таблицы-схемы после каждого раздела «Результаты» (Рис. 19, 44, 50) очень облегчают понимание и восприятие материала. Но нигде на рисунке не указано, что это результаты в сравнении с контролем.

- В тексте имеются некоторые стилистические погрешности, неточности и неудачные выражения, грамматические ошибки и опечатки (стр. 42, 45, 108 и т.д.).

- Обычно не используется выражение «в культуре *in vivo*», в данном случае правильнее говорить просто *in vivo*, в условиях *in vivo* или, в данном конкретном случае, в гидропонной культуре.

- Также, на мой взгляд, автор диссертации использует неудачное выражение «отложенный стресс», «при последующем стрессе» было бы более красиво.

- В диссертации не выделена отдельно глава «Обсуждение». Есть элементы обсуждения при описании результатов, но, на мой взгляд, довольно скудные.

- В «Заключение» никак не освещены данные по влиянию обработки растений картофеля ЭБЛ и ЭПК на экспрессию генов биосинтеза БС.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, по-видимому, следует отнести к разряду досадных неточностей в

оформлении работы. Выказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Сравнительное исследование физиологических механизмов защитного действия 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона у растений картофеля при солевом стрессе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений по актуальности, новизне, объему проведенных исследований, теоретической и практической значимости соответствует требованиям ВАК, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Ольга Константиновна Мурган заслуживает присуждения ей звания – кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.


Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,

Ведущий научный сотрудник,

Руководитель группы репродуктивной биологии растений

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,

 Захарова Екатерина Владимировна

«07» сентября 2023 года

Контактные данные:

тел. +7 (499) 976-65-44; E-mail: zakharova_ekater@mail.ru; Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.05 - физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

Тимирязевская 42, Москва, Россия, 127550, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Подпись Захаровой Е.В. удостоверяю.

Ученый секретарь
07.09.2023 г.





Федина Екатерина Игоревна