

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Боровик Ольги Андреевны «Функционирование альтернативной оксидазы и НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Выяснение механизмов устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным факторам среды, в том числе к низким температурам, является одним из наиболее важных направлений современной физиологии растений. К настоящему времени накоплен обширный и разнообразный экспериментальный материал. Однако, несмотря на это, проблема устойчивости к низким температурам не потеряла своей остроты, т.к. степень изученности многих конкретных адаптивных механизмов остается недостаточной.

В последние годы все большее внимание исследователей привлекает изучение роли альтернативных ферментов дыхательной цепи митохондрий – цианид-резистентной альтернативной оксидазы и НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ – в адаптивных реакциях растений на действие низких температур, что определяется их важными функциями в клетке, в том числе в обеспечении связи митохондрий и хлоропластов. Неудивительно поэтому, что участию альтернативной оксидазы в ответе растений на действие различных стресс-факторов был посвящен специальный номер журнала *Physiologia Plantarum* (2009, V.137, № 4). Тем не менее, функционирование этих ферментов в митохондриях у растений, выращенных в темноте и на свету, в условиях действия низких закаливающих температур мало изучено. У озимых злаков подобные данные вообще отсутствуют, также как нет сведений о влиянии накопления растворимых углеводов при холодовом закаливании растений на активность митохондрий и митохондриальных систем, несопряженных с синтезом АТФ.

Исходя из вышеизложенного, актуальность темы диссертации О.А. Боровик, посвященной исследованию функционирования альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы при холодовом закаливании, не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 178 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 37 рисунками и содержит 4 таблицы. Список литературы включает 232 источника, в том числе 178 на иностранных языках.

Во введении отражена актуальность, четко обоснованы и сформулированы цель и задачи работы, ее новизна и практическая значимость.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, в котором О.А. Боровик проанализировала состояние изучаемой проблемы. В обзоре обобщены современные

представления о процессах фотосинтеза и дыхания растений, их взаимосвязи в клетке. Подробно рассмотрено участие в механизмах адаптации растений к низким температурам изменений мембранных липидов, синтеза стрессовых белков и накопления криопротекторов (в т.ч. водорастворимых углеводов), а также процессов фотосинтеза и дыхания. Наибольший интерес представляет проведенный автором анализ роли митохондрий и альтернативных ферментов дыхания в механизмах низкотемпературной адаптации растений, а также их участие в защите хлоропластов от фотоингибирования. Несомненным достоинством обзора литературы является широкое использование публикаций последних лет, а также то, что он завершается заключением, в котором логично обоснована цель диссертационной работы.

В главе 2 представлена детальная информация об объекте, методах исследований и статистической обработке полученных данных. Автором подробно описаны условия выращивания растений, постановки опытов и методы исследований. Выгодно отличает работу использование широкого спектра современных методов, адекватных поставленным задачам. В экспериментах использованы различные субстраты для дыхания, а также ингибиторы цитохромного и альтернативного пути, что позволило автору успешно решать поставленные задачи

Глава 3 посвящена изложению полученных О.А. Боровик результатов. Большое внимание в работе уделено сравнительной характеристике реакции этиолированных и зеленых растений на действие низкой температуры. Показано, что повышение морозоустойчивости этиолированных проростков, этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы в условиях холодого закаливания сопровождалось ингибированием роста, синтезом дегидринов и сохранением содержания сахаров на высоком уровне (проростки) или его возрастанием (этиолированные и зеленые растения). Полученные данные позволили диссертанту сделать вывод о том, что ингибирование роста, накопление водорастворимых углеводов и синтез дегидринов необходимы для повышения морозоустойчивости растений как с гетеротрофным, так и фотоавтотрофным типом метаболизма.

Результаты исследования функционирования в изолированных митохондриях этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ II типа, их участия в механизмах повышения морозоустойчивости в диссертационной работе О.А. Боровик занимают основное место не только из-за их объема, но и принципиальной значимости.

Использование различных методологических подходов позволило автору получить новые и чрезвычайно важные результаты, свидетельствующие об участии альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ в ответной реакции митохондрий пшеницы на

низкую температуру. В частности, интересные данные получены с помощью ингибиторного метода, который был применен с целью проверки предположения об антиоксидантной роли альтернативной оксидазы. Автором впервые показано, что при холодовом закаливании этиолированных проростков пшеницы увеличение содержания альтернативной оксидазы в митохондриях сопровождается снижением антимицин А-зависимой генерации АФК. Это указывает на антиоксидантное действие этого фермента, препятствующее развитию окислительного стресса.

Особого внимания заслуживают результаты изучения зависимости между морозоустойчивостью растений, содержанием сахаров и активностью альтернативных ферментов с использованием экзогенной сахарозы. Обработка сахарозой, так же как низкая температура приводила к увеличению морозоустойчивости пшеницы, причем наиболее устойчивыми оказались этиолированные растения, закаленные на сахарозе, и зеленые растения, закаленные на непрерывном свете и в темноте на сахарозе.

Автором впервые продемонстрировано, что экзогенная сахароза индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов (с мол. массами 18 и 24 кД) у этиолированных и зеленых растений как в обычных условиях, так и при холодовом закаливании, что свидетельствует о защитной роли индуцированных сахарозой дегидринов.

Не менее интересны и важны данные о повышении экзогенной сахарозой при холодовом закаливании активности альтернативной оксидазы в митохондриях из этиолированных листьев при окислении всех использованных субстратов (кроме малата в присутствии ротенона), а также об увеличении содержания альтернативной оксидазы и «внутренней» ротенон-нечувствительной НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы.

Следует подчеркнуть, что автором впервые выявлены сходство и различия в активности ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в фотоавто- и гетеротрофных тканях растений пшеницы. Показано, что функционирование альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях листьев зависит от содержания водорастворимых углеводов в тканях.

Заслуживают внимания результаты работы, свидетельствующие о том, что активация альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ защищают фотосинтетический аппарат хлоропластов от фотоингибирования в условиях низкотемпературного стресса.

Результаты исследований позволили автору сделать вывод о том, что как накопление водорастворимых углеводов, так и высокая активность альтернативной оксидазы и «внешней» НАД(Ф)·Н-дегидрогеназы в митохондриях при действии низких температур автором являются важными факторами повышения морозоустойчивости пшеницы. Следует

подчеркнуть, что если первое утверждение было ожидаемо, то второе является принципиально новым.

Несомненно ценны полученные автором доказательства регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ при действии низких температур световым режимом и доступностью субстратов для дыхания митохондрий.

Совокупность полученных результатов всесторонне обсуждена в Главе 4. В ней рассмотрены общие механизмы и особенности формирования морозоустойчивости этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы; роль альтернативных ферментов дыхания в метаболизме гетеротрофных и фотоавтотрофных клеток растений при холодовом закаливании; возможные механизмы регуляции альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ в митохондриях гетеротрофных и фотосинтезирующих клетках растений при холодовом закаливании. В главе не только обобщены результаты диссертационной работы, но и предложены возможные варианты дальнейшего развития исследований в этом направлении.

Завершают работу 6 выводов, которые вытекают из результатов проведенных исследований, выполненных с использованием различных методических подходов. Выводы соответствуют поставленной цели и задачам работы.

Несомненным достоинством диссертационной работы является то, что она представляет собой серьезное исследование, содержащее обширный и всесторонне обсужденный материал. Актуальность, научная новизна работы и ее практическая значимость не вызывают сомнений. Достоверность полученных результатов и сделанных выводов подтверждена результатами статистической обработки. Положения, сформулированные в работе, обоснованы. Работа логично построена, хорошо изложена и иллюстрирована. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертации.

В целом, диссертация оставляет благоприятное впечатление, хотя необходимо отметить некоторые недостатки работы и вопросы, возникающие при ее прочтении.

1) На мой взгляд, не совсем удачно название раздела «Разветвленная дыхательная цепь митохондрий как механизм повышения адаптивного потенциала клеток растений».

2) В единице измерения освещенности сделана ошибка: вместо $\text{мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с}^{-1})$ следует писать $\text{мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$

3) Не обоснована в тексте необходимость использования в исследованиях не только 7-ми суточных этиолированных растений, но и 3-х суточных этиолированных проростков, поскольку нет принципиальной разницы в их реакции на низкую температуру.

4) Глава 4 «Обсуждение» слишком растянута. Кроме того, в ней было бы целесообразно привести обобщающую таблицу или схему для облегчения восприятия представленного материала.

5) Отсутствует заключение, в котором в кратком виде принято суммировать выявленные в ходе выполнения диссертационной работы закономерности.

Однако высказанные замечания не умаляют достоинств диссертационной работы.

Все вышеизложенное позволяет сделать заключение о том, что диссертация О.А. Боровик представляет собой законченную научную работу, выполненную на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, результаты которой вносят важный вклад в раскрытие механизмов функционирования и регуляции нефосфорилирующих путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий и роли митохондрий в процессах адаптации растений к низким температурам.

По результатам исследований диссертантом опубликовано 17 работ, в том числе 7 статей из Перечня ВАК РФ, материалы обсуждены на конференциях разного уровня.

В целом, считаю, что диссертационная работа О.А. Боровик «Функционирование альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодном закаливании» соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений».

Таланова Вера Викторовна

Главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии Карельского научного центра РАН (ИБ КарНЦ РАН), доктор биологических наук
185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11;
тел.(8142)762712, e-mail: talanova@krc.karelia.ru

Подпись В.В. Талановой удостоверяю
Заместитель директора по научной работе
ИБ КарНЦ РАН, к.б.н.



О.Н. Лебедева

25.05.2015