

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук, чл.-корр. РАН

Вл.В. Кузнецов

« 27 » мая 2015 г.



#### ОТЗЫВ

ведущей организации 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

Диссертационная работа О.А. Боровик посвящена изучению функционирования так называемых альтернативных путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании, выяснению возможных механизмов регуляции этих систем, а также их роли в повышении устойчивости растений к действию низких температур. Хорошо известно, что по сравнению с митохондриями животных, ЭТЦ митохондрий растений, кроме классического набора из 4 мультисубъединичных комплексов переноса электронов, содержит фактически еще одну ЭТЦ, состоящую из более просто устроенных переносчиков: альтернативной CN-резистентной оксидазы (АО) и нескольких ротенон-устойчивых НАД(Ф)Н-дегидрогеназ, субстратсвязывающие центры которых локализованы по обе стороны внутренней мембраны. Однако, несмотря на длительную историю изучения, функция этих белков, за единичными исключениями, остается неизвестна, поскольку перенос электронов по ним не сопровождается образованием протонного градиента и энергия, выделяемая при окислении дыхательных субстратов, рассеивается в виде тепла. В последнее время высказывается предположение, что наличие альтернативных путей окисления в ЭТЦ митохондрий растений придает ее работе большую гибкость и большую устойчивость в неблагоприятных условиях окружающей среды, в том числе при действии сниженной температуры и заморозков. Однако имеющиеся на этот счет в литературе конкретные экспериментальные данные весьма противоречивы. Трудность проведения подобных исследований заключается в том, что



активность АО и других альтернативных переносчиков электронов весьма лабильна и регулируется многими факторами, как на генном, так и на метаболитном уровне. Кроме того, функционирование этих переносчиков во многом зависит от активности и режима работы основной дыхательной цепи, механизмы регуляции активности которой в митохондриях растений, в свою очередь, остаются малоизученными. В этой связи рецензируемая работа О.А. Боровик, несомненно, актуальна. Кроме того, следует учитывать, что в нашей стране проблема приспособления растений к низкотемпературным условиям, и, в частности, изучение механизмов адаптации растений озимой пшеницы к низкой температуре и заморозкам, имеет важное не только научное, но и хозяйственное значение.

Результаты диссертационной работы показывают, что АО и, по-видимому, некоторые ротенон-устойчивые НАДН-дегидрогеназы митохондрий участвуют в процессах адаптации к низким температурам, а также в повышении морозоустойчивости побегов озимой пшеницы. Эти данные свидетельствуют, что при холодовом закаливании растений, наряду с активацией биосинтеза специфических защитных белков – дегидринов, происходит увеличение содержания в митохондриях АО, одной из функций которой при низкой температуре является снижение уровня активных форм кислорода (АФК). Полученные результаты еще раз подтверждают на конкретном примере ключевую роль митохондрий и, в целом, энергетического обмена клетки в реализации программы адаптации озимой пшеницы к низкотемпературному стрессу.

Диссертация О.А. Боровик построена по традиционному плану. Она содержит введение, обзор литературы, методическую и экспериментальную части, а также обсуждение результатов, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 178 страницах, содержит 37 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 232 источника, из них 178 на иностранном языке.

В обзоре литературы дается общее представление о процессах дыхания и фотосинтеза, а также подробно рассматриваются некоторые физиолого-биохимические механизмы адаптации растений к низким температурам, включая влияние гипотермии на процессы дыхания и фотосинтеза. Также анализируются данные, свидетельствующие об особенностях строения дыхательной цепи митохондрий растений и возможном участии альтернативных путей переноса электронов в механизмах адаптации растений к низким температурам, наряду с изменением липидной составляющей клеточных мембран и синтезом специальных стрессовых белков (дегидринов, антифризных белков), выполняющих криопротекторную функцию. Несомненным достоинством обзора являются ссылки на работы отечественных ученых (И.И. Туманова, Т.И. Труновой, В.К. Войникова



и др.), свидетельствующие о важной роли отечественной науки в формировании и развитии представлений о механизмах адаптации растений к низкотемпературным воздействиям и участии в этом процессе митохондрий. Хороший, четкий стиль изложения, а также наличие многих иллюстраций существенно облегчает восприятие и понимание описываемых литературных данных. Логичным завершением обзора литературы является специальный раздел, посвященный итоговому анализу имеющихся данных, свидетельствующих о необходимости поддержания процессов дыхания и фотосинтеза в условиях действия низких температур, а также обоснованию поставленных задач диссертационной работы.

Содержание раздела «Объекты и методы исследования» показывает, что рецензируемая работа выполнена на достаточно высоком методическом уровне. Достоинством работы является использование в качестве объекта исследований важной сельскохозяйственной культуры - озимой пшеницы. В разделе подробно описываются и характеризуются различные условия выращивания и холодового закаливания растений. Хорошее впечатление также производит стремление автора тщательно отработать и, когда надо, усовершенствовать, используемые методики, в частности, методику получения интактных препаратов митохондрий, в том числе из такого сложного объекта, как зеленые листья. Сочетание различных подходов и современных методов исследования митохондрий, включая методы ингибиторного анализа, полярографии, электрофореза, вестерн-блоттинга и др., позволило получить интересные и разносторонние результаты, обеспечило в целом успешное выполнение, поставленных в работе, достаточно сложных задач.

Наиболее яркими результатами диссертационной работы на наш взгляд являются:

а) демонстрация зависимости повышения морозостойкости озимой пшеницы от накопления углеводов, синтеза дегидринов, а также высокой потенциальной активности в митохондриях АО и некоторых ротенон-устойчивых НАД(Ф)Н-дегидрогеназ;

б) показано наличие тесной взаимосвязи между содержанием водорастворимых углеводов и повышенной активностью ряда альтернативных переносчиков электронов в ЭТЦ митохондрий, в первую очередь, АО;

в) демонстрация участия света в регуляции потенциальной активности АО и активности ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в митохондриях фототрофных клеток, что может говорить о важной роли взаимодействия между митохондриями и хлоропластами необходимого для обеспечения работы фотосинтетического аппарата, предотвращения окислительного стресса в хлоропластах, а также накопления сахаров в листьях при низкой температуре;



г) изучение некоторых механизмов регуляции альтернативных переносчиков электронов в ЭТЦ митохондрий озимой пшеницы при холодовом закаливании с применением интересного методологического подхода, заключающегося в обогащении растений сахарами путем их выращивания на растворе сахарозы. В этих условиях была показана активация ряда защитных механизмов повышающих морозостойкость растений, включая увеличение содержания низкомолекулярных дегидринов, а также активности альтернативных переносчиков электронов;

д) впервые с использованием митохондрий пшеницы выявлены различия в активности ротенон-устойчивых НАД(Ф)Н-дегидрогеназ в фото- и гетеротрофных тканях растений, что позволяет говорить об особенностях функционирования этих шунтов в разных типах тканей растений.

Несомненным достоинством работы является также попытка автора в разделе «Обсуждение» дать обобщение и развернутое объяснение полученным в работе результатам, поскольку они достаточно обширны, а трактовка некоторых из них весьма неоднозначна (см. ниже).

Научная ценность работы и новизна полученных результатов не вызывают сомнений. Вместе с тем при чтении диссертации и ее автореферата возникает ряд замечаний и вопросов:

1. Судя по описанию методики ингибиторного анализа в автореферате (стр. 7), и диссертации (стр. 62-63), а также подписи к рис. 15 в диссертации (стр. 76), в работе было изучено действие гипотермии в основном на потенциальную активность АО (или альтернативного пути –АП) в митохондриях проростков и зеленых листьев озимой пшеницы, выявляемую по ее чувствительности к БГК в присутствии цианида-ингибитора цитохромного пути окисления митохондрий. Это важный показатель, характеризующий потенциальную (или максимальную) активность АО (или  $V_{alt}$ ). Однако, как справедливо отмечает в диссертации сам автор, эта активность не всегда точно отражает реальный вклад или вовлеченность АО в дыхание митохондрий (или  $v_{alt}$ ), что, конечно, следует учитывать в трактовке полученных в работе результатов. Вообще, судя по приведенной в диссертации табл. 2, наиболее яркие и существенные для понимания ситуации данные, свидетельствующие о влиянии холодового закаливании на вклад АО в дыхание митохондрий озимой пшеницы, были получены именно в тех опытах, где была определена ее реальная вовлеченность в дыхание. Возникает вопрос, почему определение этой активности АО не было проведено в большинстве проведенных экспериментов?

2. В этой связи следует также отметить, что некоторые полученные данные не согласуются с утверждением автора (см. вывод 1) о причастности АО к повышению



морозоустойчивости побегов озимой пшеницы, поскольку при закаливании в темноте и на свету содержание белка АО в зеленых и этиолированных листьях изменялось незначительно (автореферат рис. 7д и рис. 8г), а цианид-резистентное дыхание тормозилось (там же рис. 7 а,б и рис. 8а,б,в).

3. Далее, похвальное в целом желание автора сделать обобщающие выводы на основании результатов, полученных на митохондриях, выделенных из растений разного возраста, разных тканей и подвергнутых различным воздействиям, не всегда корректны. В частности, сахароза индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов только в листьях этиолированных побегов озимой пшеницы (автореферат рис. 4в и рис. 6а), а не во всех вариантах эксперимента (см. вывод 2). Кроме того содержащееся в выводе 4 утверждению о том, что «цианид-резистентное дыхание участвует в поддержании функциональной активности митохондрий озимой пшеницы при низкой температуре независимо от типа ткани (фото- или гетеротрофная)» противоречит данным, свидетельствующим, что низкая температура ингибирует этот путь окисления в митохондриях зеленых листьев побегов (автореферат, рис. 8,а,б,в)

4. В формулировке вывода 3, в котором совершенно справедливо отмечено наличие взаимосвязи между уровнем сахаров в побегах и листьях пшеницы и активностью альтернативных путей митохондриального окисления, вместе с тем несколько смещены акценты. На наш взгляд, не только и, может быть, не столько содержание водорастворимых углеводов определяет функционирование и активность АО и других альтернативных путей митохондриального окисления, сколько, наоборот, благодаря их активации при стрессе поддерживаются процессы дыхания и фотосинтеза, обеспечивающие образование и накопление углеводов.

5. Кроме того, судя по представленным данным (автореферат рис. 1б, и рис. 2а), влияние водорастворимых углеводов на интенсивность дыхания митохондрий этиолированных проростков не столь однозначно, как заявлено в выводе 3, т.е. «содержание водорастворимых углеводов в тканях озимой пшеницы определяет интенсивность дыхания митохондрий».

6. В заключение небольшое замечание по поводу списка цитируемой литературы. В его оформлении отсутствует единообразие, часть ссылок оформлена традиционно, т.е. сначала указаны авторы, далее название статьи и журнала. Однако другая часть ссылок почему-то начинается сразу с названия цитируемой работы, а потом указаны ее авторы.

Несмотря на имеющиеся замечания, диссертационная работа О.А. Боровик производит в целом положительное впечатление. Она представляет собой большое и серьезное исследование в одной из актуальных областей современной биологии и



физиологии растений, содержит новые интересные и важные научные результаты. Автореферат в целом отражает содержание диссертационной работы. Основные данные диссертации опубликованы в нескольких статьях, в том числе в высокорейтинговом журнале «Биохимия», а также в материалах международных научных конференций.

Материалы диссертации могут быть рекомендованы для чтения лекций и дальнейшего развития на кафедре физиологии растений Биологического факультета МГУ им. Ломоносова, в лаборатории биофизики растений Агрофизического института РАСХН (Санкт-Петербург), в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва), в Институте сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН (Москва), на кафедре физиологии и биохимии растений СПГУ, на Биологическом факультете Нижегородского государственного университета, в Институте биохимии и биофизики растений Казанского научного центра РАН.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что представленная работа «Функционирование альтернативной оксидазы и НАД(Ф)Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании» отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Боровик Ольга Андреевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиологии и биохимии растений.

Отзыв был обсужден на семинаре лаборатории дыхания растений и механизмов его регуляции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Зав. лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук,  
доктор биологических наук  
Шугаев Александр Григорьевич  
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.  
Тел. 8(499)231-83-40, e-mail: ag\_shugaev@ippras.ru

*Шугаев*

27.05.2015 г.

ПОДПИСЬ  
ЗАВЕРЯЮ  
ЗАВ. ОТД. КАДРОВ



*Шугаев А. Г.*