

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Пермяковой Марины
Диомидовны, выполненную на тему «Липоксигеназы пшеницы *Triticum
aestivum* L.: генетический контроль активности, роль в качестве
клейковины и устойчивости к засухе» и представленную на соискание
ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 –
«физиология и биохимия растений»

Актуальность темы определяется важной ролью оксилипинов и основного фермента их синтеза- липоксигеназы (ЛОГ) во множестве физиологических и биохимических процессах: в защитных реакциях на стрессовые факторы, гормональной регуляции метаболизма, в определении качества клейковины зерна и тд. Эти процессы частично исследовались на модельном объекте- *Arabidopsis thaliana*. Однако, они слабо изучены у хозяйственно- ценных растительных объектов, каковым является мягкая пшеница, *T. aestivum*- сложнейший для изучения объект генетики. Сложность ее изучения обусловлена аллополиплоидной природой генома, состоящего из трех субгеномов, а также наличием огромной массы повторяющейся ДНК, что сильно затрудняет идентификацию генов и изучение их структурно-функциональной организации. Особенно большие сложности возникают при изучении мультигенных семейств, к которым и принадлежит семейство генов, кодирующих различные формы ЛОГ: растворимую микросомальную, хлоропластную и др. Понятно, что для такого количества разнообразных структурных генов фермента существует гораздо большее количество регуляторных генов, от которых зависит концентрация и активность тех или иных форм фермента в различных тканях, в разные периоды онтогенеза, под действием разнородных внешних факторов. Поэтому изучение взаимосвязи физиологических и биохимических эффектов действия ферментов такого типа с системами генетической регуляции представляет крайне сложную задачу, требующую применения самых современных методов и генетических моделей. И следует признать, что автор блестяще справилась с этой задачей. Ее диссертация представляет целостное и объемное исследование, посвященное изучению структурно- функциональных свойств ЛОГ в разных условиях среды и анализу генетической регуляции, определяющей эти свойства. Данная цель структурирована в конкретных задачах: 1) изучить изоферментный состав и активность различных форм липоксигеназы в

семенах, проростках и листьях растений пшеницы при оптимальных и стрессовых условиях выращивания; 2) выявить взаимосвязь ферментативной активности семенных ЛОГ с физиологическими и хлебопекарными параметрами пшеницы; 3) изучить влияние интрогрессии диких злаков *Ae. tauschii* и *T. timopheevii* в геном *T. aestivum* на активность ЛОГ и физиологические параметры пшеницы; 4) провести генетическое картирование локусов, ассоциированных с активностью разных форм ЛОГ и сопоставить их с данными по картированию физиологических, хлебопекарных и адаптационных признаков пшеницы; 5) определить функциональные роли для отдельных форм ЛОГ и провести поиск генов-кандидатов, связанных с регуляцией активности ЛОГ при водном дефиците.

Научная новизна исследования. В ходе работы были получены принципиально новые научные результаты, в том числе: 1) впервые выявлен изоферментный состав различных форм ЛОГ в разных органах растений пшеницы при оптимальных и стрессовых условиях и определена взаимосвязь между активностью различных форм в листьях и рядом физиологических параметров: устойчивой проводимостью, транспирацией, содержанием фотосинтетических пигментов и др.; 2) впервые проведено генетическое картирование локусов количественных признаков (ЛКП), ассоциированных с активностью нескольких форм липоксигеназы, и показана их ко-локализация с ЛКП многих физиологических признаков в геноме *T. aestivum*; 3) с помощью биоинформационного анализа на хромосоме 2AL впервые выявлены гомологи генов биосинтеза двух изоферментов ЛОГ и 50-ти кандидатных генов для регуляции ее активности; 3) впервые определена физиологическая роль для нескольких форм липоксигеназы пшеницы и показано их дифференцированное участие в адаптации к засухе; 4) впервые показано влияние интрогрессии сегментов генома диких злаков в геном *T. aestivum* L. на активность липоксигеназы и физиологические параметры, связанные с устойчивостью к водному дефициту.

Теоретическое значение работы определяется тем, что полученные результаты вносят определенный вклад в понимание важнейших физиологических и биохимических процессов, связанных с метаболизмом липидного компонента растительной клетки, роли этого компонента в стрессовой защите, а также в понимание генетических путей регуляции этих процессов. Эти результаты имеют также большое **практическое значение**. Так, идентифицированные в данной работе ЛКП, связанные с активностью разных форм липоксигеназы в геномах А, В и D гексапloidной пшеницы, можно применить в маркер-опосредованной селекции для улучшения засухоустойчивости и

технологического качества пшеницы. Понимание механизма воздействия ЛОГ на формирование клейковины пшеницы может использоваться для целенаправленного применения фермента в хлебопекарной и кондитерской технологиях с целью регуляции твердозерности и улучшения качества хлеба и кондитерских изделий. Полученные результаты могут быть использованы также в образовательном процессе, в лекционных курсах биологических и агрономических факультетов профильных учебных заведений.

Характеристика диссертации. Работа Марины Диомидовны Пермяковой представляет собой законченное исследование, отвечающее по оформлению всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 295 страницах печатного текста, включая 38 таблиц и 56 рисунков. Список цитированной литературы содержит 652 работы.

Во введении, написанном по общепринятой форме автор обосновывает актуальность выяснения роли оксилипинов и основного фермента их синтеза-ЛОГ в ряде важных физиологических процессов, формулирует цели и задачи исследования. В этом же разделе в кратком виде приводятся сведения, характеризующие работу в целом.

Литобзор состоит из 3-х основных разделов. Первый раздел посвящен характеристике семейства липоксигеназ в целом, описанию функциональной роли различных форм данного фермента в растительной клетке. Также в этом разделе охарактеризованы различные продукты окислительной реакции, катализируемой ЛОГ- оксилипины. Отдельно рассматривается роль ЛОГ в жасмонат-зависимой сигнализации. Жасмоновая кислота- важный гормон, в синтезе которого принимает участие ЛОГ. Этот гормон регулирует рост и развитие различных органов растений и во многом определяет защитные реакции растений на стрессовые факторы, в частности, засуху. Второй раздел посвящен картированию генома пшеницы и идентификации генов. Отдельная глава посвящена картированию количественных признаков. И, наконец, третий раздел описывает хлебопекарные свойства пшеницы, связанные с текстурой эндосперма и качеством клейковины, в формировании которой участвует ЛОГ. Все разделы полностью соответствуют проблематике диссертации и опираются на большой объем современных работ, давая исчерпывающее представление о состоянии данной области исследования в настоящее время.

Глава «**Материалы и методы**» содержит подробное описание растительного материала, включающего помимо материала пшениц, серии линий с замещением

хромосом, рекомбинантных линий, полученных в различных лабораториях. Даётся описание методов получения экстрактов фермента, определения его активности, электрофореза и иммуноблоттинга, определения биомассы, параметров газообмена и фотосинтеза, оценки технологических свойств зерна и муки, картирования и выявления кандидатных генов. Владение всеми этими методами позволило автору успешно решить поставленные в работе задачи.

В следующих главах диссертации подробно представлены **результаты работы и их обсуждение**. Самые основные результаты работы перечислены выше и здесь нет смысла подробно на них останавливаться. В целом, автору удалось успешно решить все поставленные задачи.

Материалы автореферата и 20 опубликованных в журналах из перечня ВАК РФ статей полностью отражают содержание диссертации. Работа М.Д. Пермяковой успешно прошла аprobацию на многочисленных всероссийских и международных конференциях.

Выводы диссертации, в целом, отражают ее содержание. Степень обоснованности выводов и научных положений не вызывает сомнений. В работе нет взаимно противоречивых выводов.

Вместе с тем, при знакомстве с диссертационной работой возникли следующие замечания:

- 1) стр.8 Задачи исследования. Пункт 1, в конце: «Выявить взаимосвязь ферментативной активности с физиологическими и хлебопекарными параметрами пшеницы». На мой взгляд, это предложение больше подходит к следующей задаче.
- 2) Для оценки реакции растений на стресс засухи использовалась следующая модель: семена проращивали в течение трех суток на воде и 12% растворе ПЭГ6000. Однако, в диссертации нет ссылок, подтверждающих, что данная модель является адекватной и широко используется для имитации реальной засухи. Есть разные модели (с использованием сахарозы, прямого подсушивания и др.), поэтому хотелось бы узнать: в чем преимущество именно этой модели?
- 3) Я не специалист по белкам, поэтому интересно узнать: почему на одних рисунках молекулярных форм ЛОГ размерность изоферментов выражена в kDa, а на других- в единицах подвижности RF? Можно ли унифицировать этот показатель?
- 4) Во многих местах (стр. 4, 10, 66, 156, 245, 265) используется неправильное написание вида: *Ae. taushii* вместо *Ae. tauschii*.

5) Вывод 5: «Интрогрессия сегментов генома *T. timopheevii* и *Ae. taushii* в геном *T. aestivum* привносит гены изоферментов ЛОГ диких злаков...». На мой взгляд, доказательств прямой интрогрессии генов изоферментов нет в данной работе. Прямыми доказательствами могла бы быть ПЦР со специфическими праймерами к генам ЛОГ диких видов.

В целом, сделанные замечания не снижают несомненной научной ценности проделанного М.Д. Пермяковой исследования, которое по своей теме полностью соответствует специальности «физиология и биохимия растений». С основными положениями, выносимыми на защиту оппонент согласен.

Заключение

Диссертационная работа Пермяковой Марины Диомидовны «Липоксигеназы пшеницы *Triticum aestivum* L.: генетический контроль активности, роль в качестве клейковины и устойчивости к засухе» является завершенной и оригинальной научно-исследовательской работой и полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор Пермякова М.Д. заслуживает присуждения ей искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

д.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»

Щербань

/Щербань А.Б./

27.03.2020

Сведения об авторе отзыва:

Щербань Андрей Борисович, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и цитогенетики растений ФИЦ ИЦиГ СО РАН

630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

Контактный телефон: +7 913 456 4836

E-mail: atos@bionet.nsc.ru

