

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН)
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук (ИФПБ РАН)

ОТЗЫВ

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

Диссертационная работа Пермяковой Марины Диомидовны основана на данных, полученных в ходе многолетних исследований, сфокусированных на ферментах липоксигеназах в мягкой пшенице. В диссертации представлены результаты работы, начатой задолго до того, как геном этой гексаплоидной культуры был секвенирован. Липоксигеназы, катализирующие образование гидроперекисей жирных кислот, являются основными поставщиками субстратов для нескольких ветвей биосинтеза оксилипинов, в том числе и для биосинтеза гормонов жасмонатов, что определяет важные плейотропные функции этих ферментов. Необходимо отметить, что семейство липоксигеназ в пшенице не было охарактеризовано до настоящего времени. Обсуждаемая работа направлена на исследование разнообразия липоксигеназ в пшенице, регуляции их активности, а также на выявление роли этого фермента в формировании устойчивости растений к засухе и качественных характеристик зерна, что обуславливает практическую значимость работы для сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Диссертационная работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 314 страницах, включает 57 рисунков и 38 таблиц, список цитированной литературы содержит 652 ссылки на статьи.

Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, связанных с предметом исследований, включая современные исследования липоксигеназ, растительных оксилипинов, в обзоре подробно описаны биосинтез и сигналинг жасмонатов, изложены некоторые генетические подходы в исследовании пшеницы, а также биотехнологические и производственно-пищевые аспекты использования этой важнейшей культуры. Глава хорошо иллюстрирована, что способствует полному пониманию текста.

В разделе «Объекты и методы исследования» все методы изложены ясно и достаточно подробно. Для решения поставленных задач в работе были использованы

методы молекулярной генетики, биохимии, физиологии растений. Все эксперименты выполнены в нескольких биологических и аналитических повторностях, представлены данные нескольких независимых экспериментов, и проведен статистический анализ, поэтому достоверность полученных результатов и выводы диссертации не вызывают сомнений.

Экспериментальная часть работы представлена девятью подглавами, которые логически связаны друг с другом и последовательно описывают результаты исследований липоксигеназ в разных сельскохозяйственных сортах пшеницы, диких родственниках современных сортов и искусственно созданных замещенных и рекомбинантных линиях. Изучение такого сложного и разнообразного биологического материала в значительной степени определяет ценность данной работы. В диссертации представлен впечатляющий объем данных - результаты исследований десятков линий пшеницы за более чем двадцатилетний период.

Основной подход в работе – это сравнительный анализ липоксигеназной активности в тканях растений пшеницы, различающихся по генотипу. Необходимо отметить, что такой параметр как активность фермента представляет собой очень трудный фенотип для анализа, так как внешние факторы могут оказывать значительное влияние на величину активности. Несмотря на это, автору диссертации удалось выявить участки генома, ответственные за исследуемый параметр, которые могут содержать как гены липоксигеназ, так и гены, вовлеченные в регуляторные процессы. Параллельный анализ ряда физиологических и/или биотехнологических параметров (в случае зерна) с последующим корреляционным анализом позволили установить сопряженность липоксигеназной активности с физиологическими характеристиками растений, параметрами качества зерна, муки и теста, полученных из этого зерна.

Стоит обратить внимание на некоторые особенно интересные наблюдения. Детальный анализ замещенных линий пшеницы Саратовская 29/Janetzkis Probat по гомеологическим группам хромосом показал существенный вклад хромосом 4-й гомеологической группы и отсутствие вклада хромосом 5-й группы в активность липоксигеназы в семенах пшеницы. Важную роль участка на 4D хромосоме в регуляции активности липоксигеназы в семенах подтвердил анализ линий Chinese Spring/Synthetic 6x. Линии Cappelle-Despres/Безостая (CD/Без), замещенные по 4-й хромосоме, показали значения липоксигеназной активности в зерне выше, чем у донора и реципиента. Участие генов хромосом 4-й гомеологичной группы подтверждается и анализом растений Chinese Spring/Synthetic 6x, выращенных в условиях дефицита воды (данные,

представленные на рис. 29), так как только линия с замещением хромосомы 4D имела такой же характер изменения, как и Synthetic 6х. Интересны случаи, когда в растениях с замещенными участками генома активность липоксигеназы выше, чем в сорте-реципиенте и в доноре, как, например, в случае интrogессированных рекомбинантных линий Chinese Spring с участками интрагрессии *Ae. taushii*. Такие эффекты могут являться свидетельством важных регуляторных взаимодействий, отвечающих за активность липоксигеназы.

Автором выявлены корреляционные взаимосвязи между активностью липоксигеназы и физиологическими характеристиками растений, некоторыми признаками зерновой продуктивности и технологическими свойствами зерна и муки, хотя в большинстве случаев величины коэффициентов корреляции были невысокими. Так, были выявлены корреляционные связи между активностью эндогенной липоксигеназы и параметрами качества клейковины. Наиболее устойчивая корреляция наблюдалась между активностью липоксигеназы и размером частиц муки (отрицательная) и удельной поверхность частиц муки (положительная). В исследованной выборке рекомбинантных инбредных линий популяции International Mapping Triticeae Initiative (ITMI) активность липоксигеназы коррелировала с несколькими параметрами, такими как масса 1000 зерен, содержание сырой клейковины, отношение упругости и растяжимости теста и водопоглотительная способность муки. В работе впервые высказана гипотеза о синергичном действии липоксигеназы и пуроиндолинов при формировании мягкой текстуры эндосперма пшеничного зерна. В результате корреляционного анализа в трех популяциях пшеницы было обнаружено, что активность липоксигеназы листьев имела корреляционные взаимосвязи с биомассой, газообменом, интенсивностью фотосинтеза и зерновой продуктивностью пшеницы, как при благоприятных условиях, так и в условиях водного дефицита, но нужно отметить, что в большинстве случаев коэффициенты корреляции по модулю были ниже 0.5. Также была выявлена связь между активностью микросомальной липоксигеназы и засухоустойчивостью растений.

Заметную вариабельность, которая обнаруживалась при исследовании разных типов линий и сортов, автор объясняет большой амплитудой значений липоксигеназной активности. Так, например, корреляция была более выражена внутри линий с высокой активностью липоксигеназы (Таблица 6). Такое предположение вполне правомерно, так как многие эффекты оксилипинов обнаруживаются в узком диапазоне концентраций.

Значительная часть данных получена с помощью биохимического подхода. Активность липоксигеназы определяли после разделения белков на нативном полиакриламидном геле или соответствующие белки выявляли с помощью иммуноблота. В работе приведено большое количество данных по наличию изоформ липоксигеназы в зернах, проростках, листьях, выявлены ферменты, отличающиеся по внутриклеточной локализации. Например, в листьях пшеницы было обнаружено пять растворимых и шесть мембраносвязанных форм липоксигеназы. Изоферментный состав , изменялся в зависимости от фазы развития, генотипа и условий выращивания растений.

Заключительная часть работы – это картирование в геноме пшеницы локусов, ассоциированных с активностью липоксигеназы, физиологическими и технологическими признаками. С использованием популяции ITMI был идентифицирован один высоко достоверный локус *QLpx.ipk-4B* на коротком плече хромосомы 4B, ответственный за полиморфизм по активности растворимой ЛОГ, и два минорных локуса на хромосоме 7B. Также были картированы хромосомные области, ассоциированные с ферментативной активностью липоксигеназы в отдельных тканях пшеницы и клеточных компартментах.

После внимательного ознакомления с диссертационной работой существенных недостатков не было выявлено, хотя технические ошибки обнаружены, что не удивительно, учитывая большой объем работы:

Рисунок 17: в тексте изоферменты обозначены как Lpx-1, Lpx-2 и Lpx-3, а на рисунке как ЛОГ-1, ЛОГ-2 и ЛОГ-3;

К сожалению, не удалось найти в тексте информацию о том, какие именно антитела были использованы в работе;

Не понятно, что означает «1 мл» в тексте «щательно растирали в фарфоровой ступке с 3 мл 80%-ого ацетона (1мл) и 10 мг CaCO₃».

Обнаруживаются неточности в некоторых фразах, переводах с английского языка. Например: «необходимы более структурные детерминанты» (стр. 17), «физиологические пропорции кетолов мало изучены» (стр. 20), «рацемически свободных или этерифицированных гидропероксидов ЖК» (стр. 26). Несколько изменяет смысл перевод с английского «рост против защиты». Правильнее было бы «рост или защита», «рост вместо защиты». Очевидно, есть ошибка в предложении «Две из них, LOX-2 и LOX-3, являются транскриптами тРНК в период семенной зрелости и сходны с соевыми LOX-2 и LOX-3 изоферментами (Domoney et al., 1999)».

Все указанные недочеты не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы. Пермяковой Мариной Диомидовной получены новые интересные данные, которые вносят существенный вклад в область исследований липоксигеназ и оксилипинов полиплоидной пшеницы, а также в решение вопросов устойчивости этой важнейшей культуры к засухе. В работе гармонично соединяются фундаментальные исследования с решением практических задач. Представленная диссертационная работа – завершенное исследование, соответствующее современному уровню научных знаний в биологии растений. Содержание диссертации отражено в автореферате. Основные научные результаты, включенные в диссертационную работу, опубликованы в рецензируемых журналах и доложены на научных съездах и конференциях.

Считаю, что объем, качество и актуальность выполненных исследований соответствуют требованиям пункта 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», установленного правительством РФ №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а соискатель Пермякова Марина Диомидовна заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.05 –«Физиология и биохимия растений».

Ведущий научный сотрудник, и. о. зав. Лабораторией фотосинтетического окисления воды Института фундаментальных проблем биологии РАН,
доктор биологических наук (специальность –
физиология и биохимия растений)

Т.В. Савченко

Контактные данные

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской Академии Наук"

Почтовый адрес: 142290, гор. Пущино, ул. Институтская, д. 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук.

Телефон: +7 (496)773-37-18.

Адрес электронной почты: savchenko_t@rambler.ru

Подпись Т.В. Савченко заверяю



ИФНЦ РАН

Н.Д. Гурьев