

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Семёновой Натальи Викторовны
«ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ЭМБРИОГЕННЫХ
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЛИСТВЕННОЙ СИБИРСКОЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений

К важнейшим компонентам фитоценозов в умеренных и холодных областях Евразии относится лиственница, которая, являясь лесообразующей породой, имеет большое экологическое, экономическое, а также эстетическое значение. Однако все возрастающее антропогенное воздействие (особенно пожары), наблюдаемое в последние десятилетия, привело к заметному сокращению не только численности популяций лиственницы, но и площади ее ареала. Кроме того, вследствие особенностей половой репродукции ей характерна нерегулярность плодоношения и низкое качество семян. Развитие методов биотехнологии открывает новые возможности для воспроизводства лиственницы через культуру *in vitro*. В свою очередь культура тканей *in vitro* позволяет изучать физиолого-биохимические изменения, которыми она сопровождается. Это особенно важно при работе с древесными растениями.

Цель диссертационной работы – выявление особенностей состава и содержания липидных компонентов каллусной ткани эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на ранней стадии культивирования.

Актуальность диссертационной работы Н.В. Семёновой обусловлена необходимостью разработки технологий, направленных на сохранение генофондов и ускоренное воспроизводство ресурсов хвойных пород. Актуальным является и выбор объекта исследований – лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.), древесина которой отличается большой твердостью и высокой устойчивостью к гниению. В мировой практике технологии клонального микроразмножения хвойных пород немногочисленны, лиственница также до сих пор остается одним из наиболее трудных объектов для индукции морфогенеза. Важным источником информации для понимания процессов, происходящих в тканях, обеспечивающих дедифференциацию клеток, инициацию каллусогенеза, соматический эмбриогенез и органогенез являются липиды, которые играют определяющую роль в структуре и функциях клеточных мембран.

Научная новизна диссертационной работы Н.В. Семёновой включает как теоретические, так и прикладные аспекты. Диссертантом впервые изучен жирнокислотный состав суммарных липидов и их отдельных фракций (нейтральных, фосфо- и гликолипидов), а также состав стероидов и их эфиров, содержащихся в каллусной ткани эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской. Сравнительный анализ показал, что каллусные ткани эмбрионных клеточных линий по сравнению с неэмбрионными характеризуются более высоким содержанием олеиновой кислоты (до 56,5 % от суммы жирных кислот). Содержание отдельных липидных групп (например, фосфатидилхолинов) также значительно выше у эмбрионных линий. Проведенные исследования позволили выдвинуть предположение об участии нейтральных липидов, фосфолипидов и стероидов в процессах дифференциации каллусной ткани в клеточных линиях *L. sibirica*. Результаты, полученные диссертантом, в дальнейшем могут использоваться для оценки перспективности клеточных линий лиственницы (а, возможно, и других хвойных пород) в отношении эмбриогенеза на ранних этапах ее культивирования *in vitro*.

Диссертационная работа Н.В. Семёновой состоит из списка сокращений (4 стр.), введения, трех глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 292 наименования (из них 229 – на иностранных языках), изложена на 174 страницах, содержит 10 таблиц и 21 рисунок (из которых 12 – авторские). Обращает на себя внимание то обстоятельство, что от всего списка литературы более 75 % опубликовано в последнее десятилетие, а среди иностранных авторов такие работы составляют почти 60 %.

Во **Введении** автор описывает актуальность поставленной темы, формулирует цель и задачи исследования, излагает основные положения, вынесенные на защиту, обосновывает научную новизну, теоретическую и практическую значимость выполненной работы, приводит список конференций, на которых были представлены полученные результаты, а также ряд других формальных сведений, требуемых от диссертанта. Введение заканчивается благодарностями. В автореферате данный раздел соответствует «Общей характеристике работы».

Глава 1, объемом 46 страниц, посвящена обзору литературы и состоит из трех разделов. В первом разделе кратко (3 стр.) даются общие сведения о липидах, включая их определение, классификацию и основные функции. Приводится упрощенная схема биосинтеза липидов. Во втором разделе (26 стр.) рассматриваются значение и роль липидов в процессах роста и развития растений. При этом отдельно описываются нейтральные липиды (включая жирные кислоты, глицериды и стерины) и полярные липиды (фосфо- и гликолипиды). В третьем разделе (16 стр.) Н.В. Семёнова останавливается на вопросах культивирования растительной ткани, акцентируя внимание на трудностях, связанных с размножением хвойных растений. Здесь же кратко дается биологическая характеристика хвойных пород в целом и лиственницы сибирской в частности. Обсуждаются пути решения проблемы культивирования хвойных видов через соматический эмбриогенез. Четвертый раздел содержит выводы (2 стр.), которые автор сделала на основании анализа литературных источников, часть из которых в дальнейшем использовала для интерпретации результатов, полученных при проведении собственных экспериментальных исследований. Иллюстративный материал включает 9 рисунков. В автореферате данный раздел не представлен.

Во **второй главе «Материалы и методы»**, объемом 13 страниц, даны характеристики объектов исследования, изложены методы количественного анализа (экстракция липидов, метилирование жирных кислот, колоночная и тонкослойная (в одно- или двумерной системе) хроматография липидов и газожидкостная хроматография их жирных кислот, а также тонкослойная (в одномерной системе) хроматография стеринов и газожидкостная хроматография их эфиров) и их идентификация. Подробно описаны методы статистического анализа. Иллюстративный материал включает 2 рисунка.

Результаты собственных исследований автора и обсуждение полученных данных представлены в третьей главе.

Глава 3, объемом 59 страниц, состоит из 5 разделов, почти все они имеют подразделы. В первом разделе (5 стр.) излагаются результаты исследования суммарных липидов и основных липидных групп в эмбриогенных и неэмбриогенных клеточных линиях *Larix sibirica*. Согласно полученным данным, абсолютное содержание суммарных липидов в каллусной ткани эмбриогенных линий достоверно выше по сравнению с неэмбриогенными. По содержанию в них преобладали нейтральные и гликолипиды, однако в тканях эмбриоген-

ного каллуса количество фосфолипидов было выше, чем в неэмбриогенных. По мнению автора это обусловлено их активным участием в процессах морфогенеза. Результаты исследований сопровождаются 1 таблицей.

Во втором разделе (10 стр.) проводится сравнительный анализ каллусной ткани разных клеточных линий по жирнокислотному составу липидов. Наиболее заметные различия между эмбриогенными и неэмбриогенными клеточными линиями обнаружены по содержанию (как в относительных единицах, так и по абсолютным значениям) в липидах моноеновых жирных кислот, главным образом, за счет олеиновой. На основании литературных данных, согласно которым олеиновая кислота может, с одной стороны, участвовать посредником в передаче сигналов в процессах клеточной дифференциации, а с другой – активирует фосфолипазу PLD δ , Н.В. Семёнова приходит к заключению, что в эмбриогенных линиях данная кислота способствует дифференциации клеток, а в неэмбриогенных принимает участие в биосинтезе фосфорной кислоты. Здесь же диссертант обсуждает важную роль жирных кислот с числом атомов углерода выше или равных 20 (в диссертации они обозначены как жирные кислоты с очень длинной цепью или ЖКОДЦ) и их возможное участие в пролиферации, дифференциации и растяжении клеток растений в ходе формирования эмбриогенных клеточных линий. С привлечением кластерного анализа диссертант показала, что изученные клеточные линии сформировали 2 основных кластера, соответствующих эмбриогенной и неэмбриогенной каллусной ткани. Во втором разделе выделен подраздел (8 стр.), где в результате изучения жирнокислотного состава отдельных фракций липидов, показано, что количество олеиновой кислоты было значительно выше в липидах эмбриогенных клеточных линий по сравнению с неэмбриогенными независимо от их фракции. Иллюстративный материал включает 7 рисунков и 4 таблицы.

В совокупности эти два раздела соответствуют первым двум из поставленных задач и *отражают третье положение*, выносимое на защиту, а именно, высокое абсолютное и относительное содержание моноеновой олеиновой кислоты в липидах каллусных тканей может служить маркером для определения способности клеточных линий к инициации соматического эмбриогенеза на ранних стадиях культивирования *L. sibirica*.

В третьем разделе (в диссертации он соответствует разделу 3.4) (21 стр.) представлены результаты изучения состава нейтральных липидов, включая моно-, ди- и триглицериды, стеринны и их эфиры, свободные жирные кислоты и их метиловые эфиры, а также воска. Обнаружено, что морфогенные ткани содержат больше триглицеридов по сравнению с неморфогенными, поскольку они играют важную роль в процессе развития каллусной культуры. При этом диссертант придерживается точки зрения о том, что, например, 1,2-диглицериды действуют как вторичные мессенджеры в клеточных процессах, являясь промежуточными звеньями в биосинтезе триглицеридов и некоторых фосфолипидов (фосфатидилхолинов и фосфатидилэтаноламинов), необходимых для формирования клеточных мембран. Низкое содержание триглицеридов в липидах неэмбриогенного каллуса автор связывает с отсутствием клеточной дифференциации.

В ходе экспериментальных исследований Н.В. Семёновой выявлены особенности в компонентном составе стеринов. В частности, доминирующим среди стеринов во всех клеточных линиях оказался β -ситостерин, но его содержание было достоверно выше в липидах каллусной ткани неэмбриогенных клеточных линий, по сравнению с эмбриогенными, что, по мнению автора, не стимулирует эмбриогенез, а способствует лишь увеличению ее общей биомассы. В этой части работы особое внимание уделяется работе фермента SSR1 (Sterol Side-chain Reductase), который участвует в образовании β -ситостерина из изофукостерина и кампестерина из 24-метиленхолестерина. Согласно мнению диссертанта, деятельность фер-

мента SSR1 в каллусной ткани эмбрионных линий направлена на синтез кампестерина, а у неэмбрионных линий – β -ситостерина. Низкое содержание β -ситостерина в каллусной ткани эмбрионных линий объясняется тем, что он выступает субстратом для brassinosteroidов, принимающих активное участие в регуляции процессов морфогенеза. Данные результаты отражают *второе положение*, выносимое диссертантом на защиту, а именно среди свободных стероидов кампестерин является основным компонентом, участвующим в процессах эмбриогенеза у клеточных линий *L. sibirica* на ранней стадии культивирования. Результаты исследований представлены на 1 рисунке и в 3 таблицах.

В четвертом разделе (в диссертации соответствует разделу 3.5) (17 стр.) представлены экспериментальные данные по изучению полярных липидов: фосфо- и гликолипидов. Показано, что каллусная ткань эмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской *in vitro* характеризуется более высоким содержанием как суммарных фосфолипидов, так и фосфатидилхолинов, фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилинозитов по сравнению с неэмбрионными. В последних доминирующей среди фосфолипидов оказалась фосфатидная кислота, накопление которой, по мнению диссертанта, отрицательно влияет не только на деление и растяжение клеток, но и на синтез фитогормонов, в частности, brassinosteroidов. Эти результаты соответствуют второй задаче и частично отражают *первое положение*, выносимое диссертантом на защиту, а именно то, что особенностью липидного профиля у эмбрионных клеточных линий *L. sibirica* на ранней стадии культивирования является значительно более высокое содержание триглицеридов, моноеновых жирных кислот, а также фосфолипидов: сигнальных и регуляторных (фосфатидилинозитов) и основных компонентов мембран – фосфатидилхолинов, чем у неэмбрионных линий. Иллюстративный материал включает 1 рисунок и 2 таблицы.

В **Заключении** (3 стр.) приводится краткое изложение основных результатов, полученных в процессе выполнения диссертационной работы. Следует обратить внимание на предложенную диссертантом схему липидного обмена, которая позволяет рассмотреть два альтернативных сценария развития эмбрионных и неэмбрионных клеточных линий лиственницы сибирской и является наглядным обобщением результатов, полученных в процессе выполнения работы.

Диссертационная работа заканчивается лаконичными **Выводами**, которые в основном корреспондируются с задачами, поставленными перед диссертантом. Они подтверждены достаточным количеством экспериментальных данных и их статистической обработкой.

Автореферат в целом соответствует структуре диссертации и отражает ее содержание.

Вместе с тем, при прочтении диссертационной работы Н.В. Семёновой возникает ряд вопросов и пожеланий. Вот некоторые из них.

1. В диссертационной работе нарушена нумерация разделов: в частности, в главе 3 отсутствует раздел 3.3 (за подразделом 3.2.1 следует раздел 3.4).

2. Список сокращений излишне большой, причем часть приведенных в нем аббревиатур упоминаются в тексте лишь однократно, например, ААФТ, ГФАТ, ЖКОДЦ-КоА, ЖКОДЦ-ПНЖК, ЛФКАТ, и с тем же подтекстом как в списке, а другие, которые активно обсуждаются автором, отсутствуют, в частности, PLD δ , АИ, MSGm и MSG.

3. При описании питательной среды на стр. 63 указана концентрация бензиламинопурина, равная 1 мг/л, а на стр. 64 – 0,5 мг/л. Какая из них является правильной?

4. В работе хорошо показано, что в эмбрионных линиях содержание олеиновой кислоты возрастает, а линолевой, наоборот, снижается (стр. 91, табл. 2–5). Уменьшение доли моноеновых жирных кислот в липидах неэмбрионных клеточных линий листовенницы сибирской при соматическом эмбриогенезе диссертант связывает со снижением активности фермента стеароил-десатуразы вследствие, например, мутации в гене *ssi2/fab2*, которая может вызывать спонтанную гибель клеток, накопление салициловой кислоты и нарушение передачи сигналов, регулируемых жасмоновой кислотой. Однако отсутствуют какие-либо предположения, объясняющие низкое относительное содержание линолевой кислоты на фоне высокой доли олеиновой кислоты и ЖКОДЦ (!) в липидах эмбрионных линий.

5. Почему в первом положении, выносимом на защиту, и в выводе № 3 при описании липидного профиля эмбрионных клеточных линий листовенницы указана фосфатидная кислота, а далее по тексту и в Заключение подчеркивается, что ее содержание выше в каллусных тканях неэмбрионных клеточных линий?

6. Почему на общей схеме липидного обмена (стр. 138) в левой колонке не представлен изофукостерин, если его содержание в каллусной ткани эмбрионных клеточных линий листовенницы сибирской существенно выше по сравнению с неэмбрионными?

7. Какие из изученных эмбрионных клеточных линий оказались наиболее высокопродуктивными, способными формировать жизнеспособные регенеранты: Кл4, Кл 6 (стр. 99) или Кл10 (стр. 116)? И соотносятся ли их характеристики с показателями липидного обмена, которые выявлены диссертантом на ранних стадиях их развития?

8. В работе имеются неисправленные технические опечатки. Например, на стр. 85 в подрисуночной подписи, третья строка сверху, в слове «десатуразное» пропущена буква «т»; на стр. 118 – 7-я строчка снизу – лишним является зачеркнутый предлог «в»; на стр. 119 – 4-я строчка сверху правильно: высокое содержаниее, а не высоконе содержанияя; на стр. 133 – 1-я строчка – лишний предлог «в» перед словом «являются». Однако при большом объеме такого рода работы опечатки являются неизбежными.

9. Другой вопрос – смысловые «опечатки». В автореферате на стр. 13, 3-й абзац снизу, 2-я строчка: достоверно выше для неэмбрионных (в тексте: эмбрионных) линий.

10. В тексте встречаются повторы. Например, предложение «... жирные кислоты играют важную роль в процессах роста и развития растений *in vivo* и *in vitro*» встречается не менее 7 раз.

11. Имеется вопрос по оформлению внутритекстовых библиографических ссылок: а) почему в публикациях двух авторов их фамилии пишутся с «and» в случае англоязычных и через «и» – русскоязычных, а не через запятую; б) при упоминании в тексте иностранных авторов их фамилии даются не только без перевода, но и с дублированием в скобках. Или это какие-то новые правила?

В целом, отмеченные недостатки и высказанные пожелания не изменяют общего положительного впечатления о работе.

Основные результаты представленной диссертации достаточно полно апробированы на Всероссийских конференциях и отражены в 12 публикациях, четыре из которых (в соавторстве) – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные базы WoS и Scopus (журналы «Физиология растений» и «Биологические мембраны»). Дополнительные неудобства в организации и проведении работ (например, по участию в конференциях за пределами региона проживания), по всей вероятности, могли внести непредвиденные ранее ограничения, сложившиеся вследствие пандемии по Covid-19.

В целом диссертационная работа на тему «ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДНОГО СОСТАВА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ЭМБРИОГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ *LARIX SIBIRICA* LEDEB.» представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задач, имеющих важное значение в области физиологии и биохимии растений, а также для развития технологий клонального микроразмножения ценных видов хвойных пород. Диссертационная работа является законченной и соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор **Семёнова Наталья Викторовна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент,

доктор биологических наук (специальность 1.5.21 – физиология и биохимия растений), доцент (РАН), главный научный сотрудник лаборатории лесных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института леса – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИЛ КарНЦ РАН)



Ветчинникова Лидия Васильевна

Адрес: 185910 Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11. ИЛ КарНЦ РАН
тел./факс (8142)76-81-60, 76-95-00,
сайт: <http://forestry.krc.karelia.ru/> e-mail: forest@krc.karelia.ru

