Отзыв

официального оппонента д.б.н. Иванова Бориса Николаевича
на диссертационную работу Мудрилова Максима Андреевича
«Роль вариабельного потенциала в развитии специфичного ответа фотосинтеза при действии локальных раздражителей различной природы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 - биофизика

Приспособление к условиям среды, учитывая неподвижный образ жизни большинства наземных видов растений, жизненно важно для них. Оно невозможно без сигнальных систем как на внутриклеточном уровне, так и на уровне целого растения. Сигнальная система, включающая генерацию и распространение по растительному организму электрических потенциалов, прежде всего, потенциала действия и вариабельного потенциала, изучена недостаточно. При этом накопилось много фактов, свидетельствующих о том, что изменение в какой-то части растения разности электрических потенциалов под влиянием внешних воздействий оказывает влияние на множество физиологических процессов в других частях растения, включая изменения в протекании фотосинтеза. Актуальными являются вопросы о различиях в электрических потенциалах, возникающих при действии различных внешних воздействий и о механизмах, обусловливающих эти различия. В работе Мудрилова М.А. был предпринят поиск ответа на эти вопросы. Принципиально важен вопрос о том, в какой мере характерные изменения электрических характеристик при том или ином внешнем воздействии обеспечивают различные ответы физиологических систем растения. Рассматриваемое исследование Мудрилова М.А., посвященное как выявлению особенностей электрического ответа растения, а конкретно, вариабельного потенциала, на различные внешние стимулы, так и характера ответа растения, прежде всего, специфических изменений протекания фотосинтетических реакций при действии на растение определенных внешних раздражителей очень актуально. В практическом плане результаты исследования могут быть развиты в последующих работах, чтобы обеспечить как прогноз о состоянии растения в тех или иных условиях, так и отбор видов или сортов растений с необходимой степенью устойчивости в конкретных условиях.

Работа Мудрилова М.А. выполнена на базе кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» и продолжает многолетние исследования в области электрической сигнализации у растений, получившие мировое признание.

Диссертация структурно построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания материалов и методов исследования (глава 2), четырех частей (разделы 3.1 -3.4 главы 3), в которых дано описание результатов исследования и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

Во Введении автором представлена актуальность исследуемой проблемы, включая обоснование выбора изучения влияния электрических реакций при действии локальных раздражителей различной природы на ответ растения, обозначена цель и основные задачи исследования, приводятся выносимые на защиту положения, отмечается научная новизна,

собственный вклад автора, приведены данные об апробации работы и другие традиционные для диссертационных работ сведения.

Обзор литературы (глава 1) - наибольшая по объему часть диссертации. Его содержание показывает хорошее знание автором всех аспектов проблемы электрических реакций в растениях и их влияния на функционирование систем метаболизма. Автор последовательно рассматривает возникновение этих реакций в ответ на охлаждение, на действие высокой температуры, освещение, механическое раздражение и повреждение. При этом описываются возможные механизмы, ответственные за возникающую реакцию, такие как потоки кальция, изменения pH вследствие изменения активности H^+-АТФазы, изменение содержания активных форм кислорода, вязкость мембраны, описывается роль ионных каналов, цитоскелета, фитохромов и других не фотосинтетических рецепторов света. Рассмотрены роли гидравлической волны и химических сигналов при электрической реакции, вызванной повреждением растения. Автор дает описание характеристик потенциала действия, вариабельного потенциала, системного потенциала, указывает процессы, которые лежат во основе каждого из этих потенциалов. Важно, что в обзоре литературы представлены литературные данные, которые позволяют автору сделать вывод о наличии «определенной специфичности типа генерируемого сигнала в зависимости от природы и, вероятно, интенсивности абиотического стимула». Также отмечается на основе данных литературы, что имеет место значительная вариабельность параметров именно вариабельного потенциала (откуда и название явления), индуцированного различными стимулами. Также автор подчеркивает, что «Основной гипотезой, объясняющей различия в параметрах вариабельного потенциала, индуцированного разными стимулами, может быть различный вклад компонентов в комплексный сигнал».

В последней части обзора автор представляет данные, которые могут указывать на специфичность ответов растения, вызванных электрическими явлениями, возникающими при действии разных стимулов. В этом разделе, однако, слишком много внимания уделено потенциалу действия, роль которого в диссертации не исследовалась. Важный вывод этой части состоит в том, что «имеется достаточно сведений о том, что функциональный системный ответ способен проявлять зависимость от параметров вызывающего его электрического сигнала». Под параметрами автор, судя по тексту, понимает различие в соотношении отдельных реакций (потоки кальция, протонов, гидравлический и химический компоненты, и т.д.), которые ответственны за характеристики возникающего электрического потенциала.

Обзор хорошо структурирован, имеются необходимые обобщающие заключения по отдельным вопросам, затронутым в нем, приводятся в таких случаях очень полезные схемы. В целом обзор литературы содержит все сведения, необходимые при постановке экспериментов в предпринятой автором работе и при обсуждении полученных результатов.

Глава 2 представляет собой описание использованных материалов и методов исследования. Это очень важная часть диссертации, т.к. позволяет оценить качество работы, а именно, какие именно характеристики тех или иных процессов были измерены с помощью использованных методов, а полнота описания этих методов позволяет судить о том, насколько адекватно они применялись. Автор последовательно описывает объекты исследования и каждый использованный метод. Дано описание применения

использованных раздражителей, - ожога, нагрева и механического повреждения, - называемых в других частях диссертации также стимулами. Описание методов достаточно ясное, хотя в ряде случаев неоправданно краткое. Очень полезны для читателя схемы расположения электродов, загрузки ингибитора и измерения активности фотосинтеза. В этот разделе следовало бы более подробно описать схему исследования влияния использованных стимулов на фотосинтетические характеристики вдали от места нанесения стимула. Рис. 6, который, вероятно, представляет эту схему частично повторен на рис. 20 в части Результаты, но в части Материалы и методы на рис. 6 нет ссылки, и можно только догадываться, что текст, ему предшествующий, описывает именно этот рисунок. В описании измерений параметров фотосинтеза отсутствует описание измерения квантового выхода фотосистемы 1, и, соответственно не расшифровано, что такое величина Pm (стр. 58). Максимальный выход флуоресценции хлорофилла на той же странице в одном случае показан со штрихом, а в другом – нет. Наиболее адекватно описаны определение содержания фитогормонов и алгоритм обработки результатов. В целом, описание материалов и методов позволяет, хотя и не без трудностей, понять ход проведения экспериментов и положительно оценить примененные экспериментальные подходы.

В главе 3 описание результатов объединенно с их обсуждением, что оправдано самим характером материала. В разделе 3.1. описано изучение параметров вариабельного потенциала (ВП), вызванного раздражителями различной природы. Получены действительно интересные результаты, во многом дополняющие как данные, полученные ранее в коллективе кафедры биофизики, где выполнялась работа Мудрилова М.А., так и данные, имеющиеся в литературе. Ценно, что с использованием единого подхода в работе Мудрилова М.А. было проанализировано влияние трех раздражителей. Нет, наверное, необходимости перечислять конкретные результаты. Важно, что они позволили сделать вывод о том, что при наличии похожих черт различия в параметрах вариабельного потенциала, лучше назвать их характеристиками, показывают специфическое действие разных раздражителей, т.е. каждый раздражитель (стимул) вызывает особый вариабельный потенциал.

К сожалению, рисунки 8 и 9, представляющие полученные результаты, плохо оформлены. Прописные буквы обозначают и отдельные части рисунка и «статистически значимые различия между стимулами», а цвета кривых, относящихся к отведению потенциала электродами, находящимися на разном расстоянии от зоны раздражения, совпадают с цветами стимула. Такие обозначения на рисунке одинаковыми символами разных вещей совершенно недопустимы. На рис. 9 неясно, откуда появилось 5 значений в его части 9Б, и 4 значения в части 9Г, хотя показано, и в подписи подтверждено, отведение потенциалов только тремя электродами. В этом же разделе на стр. 69 описывается измерение параметров ВП в нераздраженном листе, но результаты не представлены в виде рисунка или таблицы.

В разделе 3.2. представлены результаты ингибиторного анализа механизмов генерации и распространения ВП, вызванного разными раздражителями. Полученные результаты показали похожее участие снижения активности H^+-АТФазы плазмалеммы в генерации ВП и при ожоге, и при постепенном нагреве. В то же время, роль механочувствительных Ca^{2+} каналов в генерации ВП оказалась более существенной в случае ожога как для пшеницы, так и для гороха. Участие АФК, активирующих лиганд-

чувствительные Ca^{2+} каналы, наоборот, было найдено более значимым в случае постепенного нагрева, причем показано определяющее значение активности НАДФН-оксидазы. Полученные важные результаты позволили Мудрилову М.А. предположить, что различия между индуцированными нагревом и ожогом ВП, по-видимому, обусловлены различным соотношением гидравлического и химического сигналов, причем в случае ожога основную роль в распространении ВП играет гидравлическая волна., а в случае нагрева – волна АФК. Опять можно предъявить претензии к оформлению рисунков в этой части диссертации. Только на рисунках 11 и 18 указано, что опыты проводились с пшеницей и горохом, соответственно; на рисунках 12-17 нет указаний на объект исследования.

Раздел 3.3. является ключевым в диссертации, учитывая, что в названии работы фигурирует развитие «специфического ответа фотосинтеза». Развитие ВП было сопоставлено с изменением скоростей фотосинтеза и транспирации, а также такими характеристиками функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи как квантовые выходы фотосистем 1 и 2 и нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (НФХТ). Скорость ассимиляции CO_2 в не раздражаемом листе гороха снижалась при развитии ВП вследствие и постепенного нагрева, и ожога раздражаемого листа, но при механическом повреждении эффекта не наблюдали. Изменения транспирации наблюдали при действии всех раздражителей. Важным наблюдением оказалось то, что изменения квантовых выходов, их понижение, и повышение НФХТ после «прихода» ВП в исследуемый лист имели двухфазный характер, и величина этих изменений была значительнее при нагреве, чем при ожоге. Опыты на пшенице подтвердили описанный характер изменений квантового выхода фотосистемы 2 и НФХТ. Далее автор анализирует изменения фотосинтетических характеристик при действии разных раздражителей, сопоставляя амплитуды первой и второй фаз наблюдаемых ответов. Анализ, несомненно, полезный и важный, и он показал дополнительные характерные различия в изменении этих характеристик при разных стимулах, но следовало бы более четко обозначить границы фаз в случае ответа каждого показателя и указать, брали ли для значения амплитуды одну какую-то точку или рассчитывали это значение иным способом.

В этом разделе опять плохо с представлением результатов на рисунках. На рис. 20 опять одни и те же прописные буквы обозначают и часть рисунка, и раздражитель. В подписи к этому рисунку часть рисунка, обозначенного на нем буквой «Б», обозначена буквой «В». Не понятно, что такое «Э» в подписи к рисунку 21. Не указано, какие части изменения кривых параметров флуоресценции хлорофилла берутся как первая и вторая фазы для рисунков 22 и 24. На рисунке 22 в части Б не указано на осях значение для квантового выхода фотосистемы 1. На рис. 24 кривые разного цвета показывают результат разных воздействий, а в подписи к рисунку указано, что «Разными цветами обозначены области регистрации активности фотосинтеза».

В разделе 3.4. представлен ценный материал, позволяющий высказать вполне обоснованные предположения о причинах различий ответных реакций фотосинтеза при действии разных раздражителей. Измерения динамики изменения pH в апопласте не раздражаемых частей листа пшеницы показали, что эти изменения носят двухфазный характер и их динамика зависит от природы стимула, вызвавшего волну ВП. При нагреве первая кратковременная фаза слабо затухает по мере удаления от зоны раздражения, а при

ожоге затухание существенно более быстрое. Это хорошо соответствует особенностям быстрой фазы ответа фотосинтетических параметров в ответ на эти раздражители. Автор на основании данных литературы и собственных результатов связывает быструю фазу обоих изменений с инактивацией H^+-АТФазы плазматических мембран при генерации ВП. Исследование динамики содержания абсцизовой и жасмоновой кислот при действии ожога и постепенного нагрева показала, что ВП вызывает сдвиги содержания этих гормонов в не раздражаемых участках листа пшеницы, и предположить, что долговременное подавление фотосинтеза во второй фазе, по крайней мере, у пшеницы связано с изменением концентрации в листе жасмоновой кислоты.

В этом разделе вызывает вопрос утверждение автора, сделанное после представления данных о корреляциях в Таблице 3, а именно, «Это позволяет предположить о большем участии ВП в регуляции первой, кратковременной фазы фотосинтетического ответа». Выглядит так, будто бы вторая фаза ответа не связана с ВП, хотя автор сам пишет, что «ВП вызывает сдвиги концентраций гормонов в нераздраженных участках листа» (стр. 96).

Основной рисунок этого раздела, рис. 25, как и многие рисунки до него, плохо оформлен. Одни и те же прописные буквы обозначают и часть рисунка, и «статистически значимые различия между стимулами»; линии разного цвета показывают результат разных воздействий, а в подписи к рисунку указано, что разные цвета обозначают и «области регистрации активности фотосинтеза». Как и на рисунках 22 и 24 не указано, какие части кривых изменения pH берутся как первая и вторая фазы.

В Заключении приведена схема, показывающая влияние ВП на изменения pH и содержания жасмоновой кислоты в результате действия постепенного нагрева или ожога, что, в свою очередь, вызывает наблюдаемые изменения фотосинтеза во времени. Появление такой схемы – очень ценный результат работы автора диссертации и ее дальнейшая разработка, несомненно, явится важным этапом в решении проблемы приспособления растений к быстро и медленно меняющимся факторам среды.

Предлагаемые в конце диссертации выводы корректны и точно отражают ключевые результаты диссертационной работы.

Замечания и вопросы относятся к оформлению результатов работы в диссертацию, и ни в коей мере не умаляют качества интересной и важной работы Мудрилова М.А.

Диссертационная работа Мудрилова Максима Андреевича «Роль вариабельного потенциала в развитии специфичного ответа фотосинтеза при действии локальных раздражителей различной природы» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по изучению формирования стимул-специфичного системного ответа растений при действии локальных раздражителей. Работа характеризуется научной новизной, результаты исследования достоверны. К достоинствам диссертационной работы следует отнести широкий спектр методов исследования, позволивших выполнить комплексное исследование механизмов формирования специфичного системного ответа при действии на растения различных раздражителей. Результаты работы опубликованы и представлялись автором на международных и всероссийских конференциях. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем отражены основные результаты и выводы, новизна и практическая значимость исследования.

По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, а ее автор Мудрилов Максим Андреевич заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – биофизика.

Официальный оппонент:

главный научный сотрудник
Института фундаментальных проблем биологии
обособленного структурного подразделения ФГБУН ФИЦ
«Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

доктор биологических наук Борис Николаевич Иванов

Адрес: 142290, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, д. 2
Телефон: +7 (496) 773-27-15
эл. почта: ivboni@rambler.ru

Подпись Иванова Бориса Николаевича заверяю

Ученый секретарь
к.ф.-м.н. Гудков Николай Демьянович

25.08.2022