

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Гринберг Марины Антоновны**
«Влияние хронического облучения на электрические сигналы растений и их роль в
формировании устойчивости к стресс-факторам», представленную в докторской диссертационный
совет 24.2.340.06 при Нижегородском государственном университете им. Н. И.
Лобачевского на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по научной специальности 1.5.2. Биофизика

Актуальность работы. Диссертационная работа М.А. Гринберг посвящена одной из важных и актуальных проблем биофизики – исследованию модифицирующего действия ионизирующих излучений (ИИ) на электрические сигналы растений, возникающие в ответ на тепловой стресс, с детальным анализом формирования функциональных ответов и адаптации организмов к последующим неблагоприятным воздействиям.

Тема диссертации полностью соответствует паспорту заявленной научной специальности. Паспорт специальности 1.5.2. Биофизика включает направление 4: теоретическое и экспериментальное исследование физических процессов, протекающих в биологических системах разного уровня организации, в том числе исследование воздействия различных видов излучений и других физических факторов на биологические системы. Работа выполнена строго в рамках избранной темы, соответствует поставленным целям и задачам.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, определяется большим объемом экспериментальных данных, применением современного высокоточного оборудования и апробированных методик. Данные хорошо воспроизводятся и не противоречат результатам исследований других авторов. Все выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы и достоверны.

Научная новизна полученных результатов. Обнаружено, что низкоинтенсивные ИИ влияют на параметры дистанционных электрических сигналов растений и изменяют формирование функциональных ответов. Подтверждена гипотеза о том, что в основе эффектов ИИ лежит изменение активности внутриклеточных сигнально-регуляторных систем растений, касающихся процессов фотосинтеза, аккумуляции СО₂, транспирации. Впервые показано, что действие ИИ на электрические сигналы и вызванные ими физиологические реакции, изменяют устойчивость растений к последующему действию стрессоров.

Значимость выводов и рекомендаций для науки и практики. Результаты диссертационного исследования вносят вклад в создание единой концепции работы сигнально-регуляторных систем растений. Полученные данные проясняют механизмы влияния хронического облучения на электрические сигналы растений и порождаемые ими функциональные реакции, а также констатируют изменение адаптации к последующим стрессам на фоне действия ИИ. Полученные результаты могут быть использованы для фундаментальных исследований и прикладных разработок на территориях с повышенным радиационным фоном, а также для планирования работ в рамках создания искусственных экосистем для космических миссий. Результаты и выводы диссертационного исследования могут быть использованы в учебном процессе для студентов и аспирантов биологического профиля.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации. Апробация работы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, включая 4 статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of

Science, Scopus), входящих в список ВАК. Основные результаты работы были представлены на 10 научных школах и конференциях.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Объем диссертации составляет 106 страниц машинописного текста, включает 27 рисунков. Список литературы содержит 216 источников.

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлен вклад автора на всех этапах выполнения работы, а также апробация результатов исследования.

Глава 1. Обзор литературы. В главе приведен обзор исследований отечественных и зарубежных авторов по теме диссертации. Описаны основные закономерности влияния ИИ на рост и развитие растений, а также на физиологические процессы. Даны классификация дистанционных электрических сигналов растений, описаны особенности их генерации и распространения. Проанализированы индуцированные электрическими сигналами функциональные ответы. Представлена оценка влияния ИИ на электрические сигналы и другие сигнально-регуляционные системы растений.

Глава 2. Материалы и методы Дано характеристика объектов исследования (пшеница *Triticum aestivum* L. и табак *Nicotiana tabacum* L.), материалов и оборудования, подробно описаны методики исследований. Облучение проводили с помощью закрытого источника ^{90}Sr . Измерение параметров электрогенеза проведено с помощью макро и микроэлектродной техники. Параметры фотосинтеза и устьичной проводимости измерены с помощью инфракрасного газоанализатора и РАМ-флуориметра (Heinz Walz GmbH, Германия), расчёт параметров квантового выхода фотосистем (Φ_{PSI} и Φ_{PSII}) и нефотохимического тушения флуоресценции (NPQ) произведен программным обеспечением прибора. Об устойчивости к тепловому стрессу пшеницы судили по сохранности фотосинтетических показателей после прогрева растений (45 мин при температуре 50°C). Величину внутриклеточного pH у табака оценивали по уровню флуоресценции генетически кодируемого ратиометрического pH-чувствительного белка Pt-GFP, спектры флуоресценции получали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Zeiss, Германия). Измерения сдвигов pH, вызванных ВП, на уровне целого растения проводились при помощи установки флуоресцентного имиджинга DVS-03. Для обработки данных применяли статистические методы.

Глава 3. Влияние ИИ на морфофункциональное состояние растений в покое. В экспериментах с хроническим облучением показано: 1) увеличение ряда морфометрических показателей у пшеницы (у табака на уровне тенденций); 2) квантовые выходы Φ_{PSII} и Φ_{PSI} и уровень NPQ у пшеницы не изменялись, а у табака ИИ вызывало возрастание квантового выхода Φ_{PSII} ; 3) у обоих видов значимое возрастание ассимиляции CO₂ и транспирации, которая коррелирует с устьичной проводимостью; 4) активация H⁺-ATФазы, которая переносит протоны из цитоплазмы клеток в апопласт, порождая каскад реакций (усиление оттока ассимилянтов, изменение pH цитоплазмы и равновесных потенциалов ионов, увеличение осмотического потенциала воды в замыкающих клетках устьиц). Энергия деполяризации в клетках облученных растений была значимо выше, чем в контрольных вариантах. Результаты подтверждают данные литературы, что ИИ в малых дозах влияют на физиологические процессы преимущественно на уровне активности имеющихся в клетке компонентов, а не их количества. В ходе анализа обозначены множественные потенциальные пути влияния сигнальных систем, в первую очередь,

гормональной и кальциевой сигнализации. Сигналом к модификации, вероятно, является индуцированное ИИ повышение концентрации активных форм кислорода (АФК).

Глава 4. Влияние ИИ на ВП и вызываемые им функциональные ответы. Установлено, что у пшеницы ИИ способствует снижению пороговой температуры, при которой возникает ВП, кроме того электрические сигналы усиливаются, увеличивая амплитуду и скорость распространения, а также скорость деполяризации и площадь охваченной сигналом области. У табака облучение не оказывало значимого влияния на амплитуды ВП. Проведен анализ современных представлений о распространение ВП, согласно которому за этот процесс отвечают: АФК-активируемые кальциевые каналы, Ca^{2+} -чувствительные анионные каналы, потенциал-зависимые калиевые каналы, протонная-АТФаза и НАДФН-оксидаза плазматической мембранны. Повышение концентраций АФК при облучении может быть первопричиной усиления ВП.

Исследованы функциональные ответы растений, вызванные ВП, при облучении и без него. Реакция фотосинтетической системы у обоих видов имеет кратковременную (3-10 мин) и долговременную фазы (1.5 ч. и более). У пшеницы ИИ не меняет направленность процессов, но возрастает амплитуда ответов. У табака на первой фазе отмечено повышение интенсивности фотосинтеза (Φ_{PSII} возрастает, NPQ снижается), а на второй – глубокое подавление. Под действием ИИ амплитуды изменений уменьшаются по мере удаления от места раздражения, а площадь листа, охваченная изменениями, увеличивается. Ответ транспирации на прохождение ВП по листу у обоих видов также развивается в две фазы. Во время кратковременной фазы транспирация возрастает, во время длительной она снижается. ИИ существенно увеличивает амплитуду вызванного ВП снижения транспирации. В качестве вероятного механизма долговременного закрывания устьиц, вызванного ВП, рассматривается повышение концентрации фитогормонов (ЖК и АБК). Сдвиги рН у табака зафиксированы после прохождения ВП, закисление цитоплазмы охватывало всю площадь листа. В контроле амплитуда сдвигов снижалась по мере удаления от места раздражения, а под влиянием ИИ – возрастила.

Представлялось логичным, что усиленные под действием ИИ электрические сигналы будут вызывать более интенсивные функциональные ответы. Но корреляционный анализ показал, что у обоих видов без облучения имеются положительные корреляции между амплитудой ВП и амплитудами ответов Φ_{PSII} и NPQ , а у облучённых растений подобные корреляции нарушаются. У табака, к этому добавляется наличие без облучения корреляции между амплитудой ВП и амплитудой сдвигов рН и ее отсутствие при действии ИИ. Автор предполагает, что формирование функциональных ответов происходит при более низких амплитудах стрессового сигнала. Модификация происходит на последнем этапе в цепи событий: ВП – сдвиг рН – ингибирование фотосинтеза. По данным литературы приводится ряд обоснований этого предположения, которые требуют проверки в ходе дальнейших исследований.

Глава 5. Влияние ИИ на вызываемую ВП устойчивость к тепловому стрессу. Представлены результаты эксперимента по влиянию ВП, индуцированного кратковременным нагревом, на устойчивость пшеницы к длительному тепловому стрессу в условиях облучения и без него. После нагрева направленность реакций (распространение ВП, развитие функционального ответа фотосистемы-II через 3 и 24 ч) у контрольных и облучённых растений совпадала, различия касались амплитуд ответных реакций, области охвата и времени проявления. Фон перед нагревом, обеспечивший наибольшую устойчивость, был в вариантах: «ВП без ИИ» и «ИИ без ВП». Совместное действие ИИ и ВП привели к инверсии параметров устойчивости растений к тепловому стрессу. Автор предполагает, что вмешательство ИИ на уровне сигнальных систем и избыточно-сильные ответные реакции организмов привели к качественно новому результату. Возможно, другие стрессоры будут вызывать другие адаптивные ответы.

Заключение. В этом кратком разделе не только подводится итог диссертационной работы, но и намечаются пути дальнейших исследований.

Выводы основаны на полученных автором экспериментальных результатах, на их анализе с привлечением литературных данных, статистически подтверждены и являются достоверными.

Таким образом, все поставленные в рамках темы задачи выполнены автором в полной мере, продуманно и корректно. Результаты свидетельствуют, что хроническое облучение в относительно малых дозах вызывает нарушение гомеостаза в организме растений. При морфологическом анализе негативные последствия облучения неочевидны, проявляются признаки гормезиса. Между тем ИИ вызывает нарушения скоординированных систем сигналинга и саморегуляции, поддерживающих динамическое равновесие, и при действии дополнительных стрессовых факторов (нагрев) выявляются негативные эффекты.

К работе имеется ряд замечаний и пожеланий.

1) Возникают вопросы к дозиметрии. Автор не дает описания алгоритма расчета дозы, а это важно с учетом определенной специфики бета-излучения ^{90}Sr .

2) Довольно часто автор пишет об увеличении или уменьшении показателей на уровне тенденций. Например, рис .6 «Уровень NPQ при облучении несколько снижался», но не достоверно». Или стр.57, рис. 15 у табака «имела место некоторая тенденция к усилению сигнала у облучённых растений». Однако только статистическая оценка позволяет сделать заключение о значимом эффекте. Если есть возможность повысить точность измерений, ее желательно использовать.

3) Автор исследовала два вида растений: из класса однодольных (пшеница) и двудольных (табак). Выявлен ряд видовых различий, которые позволяют предполагать межвидовую изменчивость реакций растений на ИИ+ВП. Желательно обсудить этот феномен с привлечением литературных данных и учитывать в будущих исследованиях.

4) На стр. 54 приводится схема, в которой выделены три этапа, ведущие к развитию интегральной устойчивости 1) рецепция стрессора, генерация и распространение дистанционного сигнала, 2) развитие вызванных сигналом функциональных ответов, 3) формирование интегральной устойчивости организма к стрессору. Для будущих исследований было бы полезно добавить еще один этап – затухание сигнала после воздействия. Важно знать, какие механизмы возвращают динамическое равновесие к норме или приводят к повышению/понижению устойчивости в разные периоды времени. Известно, что «stress memory» может проявляться в течение длительного периода. Приведенные в работе результаты уже закладывают основу для такого анализа.

5) Обосновав необходимость продолжения работы, автор упомянула системы АФК- Ca^{2+} и гормональной регуляции, как на уровне активности сигнальных путей, так и на уровне генетической регуляции количества их компонентов. Можно было бы расширить ряд задач, включив в него белки теплового шока.

6) Отмечено небольшое количество неточностей и опечаток. Например, автор указала, что список литературы «содержит 216 источников, в том числе 213 работ иностранных авторов». На самом деле многие статьи, опубликованные в иностранных журналах, написаны российскими авторами.

Замечания, сделанные в отзыве, не умаляют значимости работы и не отражаются на выводах и основных положениях, выносимых на защиту, большинство из них могут расцениваться как предложения по развитию дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Гринберг Марины Антоновны на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании полученных автором результатов изложены новые научно обоснованные данные, имеющие существенное значение для развития биофизики и радиобиологии, в частности, для оценки роли электрических сигналов в целостной сигнально-регуляторной системе растений и влияния ионизирующих излучений на адаптивные возможности растений к действию внешних стрессоров.

Диссертационная работа соответствует требованиям пунктов 9–14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842, которым должны отвечать диссертации на соискание ученых степеней, а ее автор **Гринберг Марина Антоновна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2. Биофизика.

Оппонент: Позолотина Вера Николаевна
доктор биологических наук (специальность 03.02.08 – экология), с.н.с.,
зав. лабораторией популяционной радиобиологии
Института экологии растений и животных УрО РАН
Адрес: 620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202
Тел. (343) 210-38-58 доб. 118
E-mail: pozolotina@ipae.uran.ru
Сайт https://ipae.uran.ru/Pozolotina_VN
20 октября 2023 г.

Подпись оппонента Позолотиной Веры Николаевны заверяю

Ученый секретарь Института экологии растений и животных УрО РАН, к.б.н.
Городилова Юлия Владимировна

