

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Печёриной Анны Александровны «Индукцированные засолением дистанционные сигналы и их роль в изменении активности фотосинтеза у картофеля», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – «Биофизика»

Для существования растительного организма в постоянно меняющихся условиях среды необходима координация процессов между его различными органами, которая обеспечивается дистанционными сигналами. Несмотря на отсутствие нервной системы, характерной для животных, растения демонстрируют высокоинтегрированную систему коммуникаций, использующую химические, электрические и гидравлические сигналы для согласованной работы клеток, тканей и органов. Локальное воздействие стрессоров индуцирует системный ответ, что невозможно без передачи сигналов на дальние расстояния. Однако природа этих сигналов в ответ на различные стрессоры, а также вклад конкретных типов сигналов в индукцию специфических функциональных изменений остаются малоизученными. Это обуславливает актуальность диссертационной работы А.А. Печёриной, которая посвящена исследованию распространяющихся по растению сигналов и их роли в модуляции активности фотосинтеза.

Выяснение механизмов формирования солеустойчивости, в частности роли системной сигнализации, важно не только для фундаментальной науки, но и для понимания общих принципов адаптации растений к абиотическим стрессорам, что подчеркивает практическую значимость данной работы.

А.А. Печёриной обнаружены быстрые изменения активности фотосинтеза, которые наблюдались уже в течение первых минут после обработки корней картофеля хлоридом натрия (NaCl). Установлено, что выявленные изменения связаны с передачей сигналов из корня в побег. Изучение дистанционной сигнализации во многом стало возможным благодаря использованию трансгенных растений арабидопсиса, конститутивно экспрессирующих флуоресцентные белки-сенсоры.

Диссертационная работа А.А. Печёриной изложена на 156 страницах и содержит 34 рисунка и 3 таблицы. Работа написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, главы результатов с обсуждением, заключения и выводов. Список литературы содержит 479 источников, из которых 473 – на иностранном языке.

Во введении обосновывается актуальность темы, четко формулируются цели и задачи исследования.

Обзор литературы посвящен анализу влияния засоления на морфологические характеристики растений и физиологические процессы с акцентом на фотосинтез. Подробно описана внутриклеточная и дистанционная сигнализация при засолении. Рассмотрены возможные пути влияния засоления на активность фотосинтеза, обсуждены возможные механизмы трансдукции дистанционных сигналов. Содержание обзора литературы соответствует изучаемой проблеме, а его качество свидетельствует о том, что соискатель хорошо ориентируется в научной литературе по теме диссертации.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены принципы и методы исследования, дизайн экспериментов и используемое оборудование. В работе А.А. Печёриной использован широкий круг современных методов исследования. Измерение уровня  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$  и  $H_2O_2$  выполнялось путем анализа флуоресценции генетически

кодируемых сенсоров. Для этой цели А.А. Печёриной впервые были получены растения картофеля конститутивно экспрессирующие гены, кодирующие рН-чувствительный сенсор Pt-GFP,  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный сенсор Case12 и  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительный сенсор HyPer7, которые получали методом генетической трансформации с помощью бактерий рода *Rhizobium* – *Agrobacterium tumefaciens*.

Электрические потенциалы регистрировали с помощью хлорсеребряных электродов, прохождение гидравлических сигналов – с помощью чувствительной оптической системы. Фотосинтетическую активность оценивали РАМ-флуориметрией, транспирацию – с помощью термографии по индексу водного стресса CWSI (Crop Water Stress Index).

Глава 3 (Результаты и обсуждение), состоит из 4-х разделов. Первый раздел посвящен созданию растений с генетически кодируемыми флуоресцентными сенсорами и проверке возможности регистрации с их помощью изменений уровня  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Индукция сигналов с помощью тестовых воздействий подтвердила реальную возможность использования растений с полученными сенсорами для изучения кальциевого и АФК сигналинга.

В разделе 3.2. экспериментальной части работы приводятся сведения о влиянии обработки корневой системы картофеля NaCl на активность фотохимических процессов. Обработка NaCl корневой системы растений картофеля, выращиваемых в почве, вызывала снижение  $F_v/F_m$  и  $\Phi_{PSII}$  и повышение NPQ, что свидетельствует о снижении общей активности фотосинтеза.

У микрорастений, выращенных в условиях *in vitro* после обработки NaCl также происходило изменение параметров флуоресценции хлорофилла. При этом был выявлен трехфазный характер снижения активности фотохимических процессов фотосинтеза при обработке NaCl. Первая фаза, характеризующаяся переходным увеличением NPQ и незначительным снижением  $\Phi_{PSII}$ , у микрорастений начиналась через 20 минут после обработки NaCl, вторая, характеризующаяся повторным ростом NPQ и выраженным снижением  $\Phi_{PSII}$ , – через 60-70 минут, третья фаза, в которой наряду с изменениями NPQ и  $\Phi_{PSII}$  происходило снижение  $F_v/F_m$ , – через 4-5 часов.

Третий раздел главы 3 посвящен сравнительному анализу роли ионного и осмотического компонентов засоления в изменении активности фотосинтеза. Показано, что как ионный, так и осмотический компоненты засоления индуцируют  $\text{Ca}^{2+}$ -волну, которая, по-видимому, служит триггером наблюдаемого падения фотохимической активности.

Четвертый раздел экспериментальной части диссертации посвящен выяснению возможных механизмов регуляции фотосинтеза сигналами о засолении, поступающими от корней к побегам. Установлено, что засоление вызывает распространяющиеся из корня в побег гидравлический сигнал и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал. Обработка NaCl вызывала увеличение в корневой системе уровня АФК и изменения цитозольного рН, которые могли повлиять на амплитуду  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала. Распространяющийся  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал, главным образом, индуцированный  $\text{Na}^+$ , вносит основной вклад в раннее снижение активности фотосинтеза.

Изложение результатов и их обсуждение сопровождается хорошо оформленными иллюстрациями и сопоставлением с данными современной литературы.

В разделе Заключение А.А. Печёрина приводит оригинальную гипотетическую схему, которая демонстрирует возможные механизмы регуляции фотосинтеза сигналами о засолении, поступающими от корней к побегам.

В ходе выполнения работы А.А. Печёрина получила значительный объем экспериментальных данных, выполнила их корректную статистическую обработку и всесторонний анализ. Диссертантом впервые созданы трансгенные растения картофеля, конститутивно экспрессирующие гены, кодирующие флуоресцентные сенсоры: рН-чувствительный Pt-GFP,  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный Case12 и  $\text{H}_2\text{O}_2$ -чувствительный сенсор. С использованием полученных линий впервые показано, что у микрорастений картофеля, выращенных *in vitro*, обработка NaCl уже через 10–20 минут вызывает снижение фотохимической активности фотосистем. Выявлен трехфазный характер этого снижения. Установлено также, что солевой стресс индуцирует распространяющуюся от корней к побегам  $\text{Ca}^{2+}$ -волну, которая, предположительно, является триггером наблюдаемого падения фотохимической активности.

Выводы, представленные в диссертационной работе, базируются на полученных автором результатах. Основные результаты опубликованы в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях и апробированы на международных и всероссийских конференциях.

Результаты диссертационного исследования дополняют теоретические представления о влиянии засоления на чувствительные к засолению растения и о системе дальнейшей сигнализации растительного организма. Полученные А.А. Печёриной результаты могут быть использованы в дальнейшем для разработки новых подходов повышения устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Полученные знания также могут быть использованы при разработке и модернизации учебных дисциплин для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

Диссертационная работа А.А. Печёриной в целом производит хорошее впечатление. Вместе с тем имеется ряд вопросов и замечаний:

1. Для сенсора Pt-GFP приведена калибровка, и изменение его флуоресценции пересчитано в единицах рН. Однако исходные рассчитанные значения рН цитозоля не представлены (ни в диссертации, ни в автореферате).
2. В работе показано, что при обработке корней картофеля NaCl распространяющийся к побегу электрический сигнал не регистрируется. Вопрос: насколько типично отсутствие электрического сигнала, вызванного засолением, для других видов растений?
3. Выявлен трехфазный характер снижения активности фотохимических процессов фотосинтеза при обработке NaCl. Вопрос: изменение каких конкретных фотосинтетических (или иных) процессов отражает каждая из трех фаз снижения активности фотосинтеза, индуцированного засолением?
4. В работе продемонстрирована возможная сигнальная роль кальциевой волны в индукции изменений активности фотосинтеза при действии NaCl. Согласно полученным результатам, наряду с кальциевой волной происходила передача также и гидравлической волны. Вопрос: какова роль гидравлической волны в индукции системного ответа?
5. Текст диссертации не лишен опечаток и неудачных выражений. Например, стр.13 - «каратиноидов», стр.16 - «антиоксидазных систем», стр.18 -«кслоту», «необходим необходим», стр.75 -«увеличинию», растения трансформационных линий (стр 63).

Указанные замечания не снижают общую положительную оценку работы. Диссертационная работа Печёриной А.А. посвящена решению актуальной научной задачи, исследование выполнено на высоком методическом уровне. Основные результаты

