

ОТЗЫВ

официального оппонента

кандидата биологических наук, доцента Ермошина Александра Анатольевича на диссертационную работу Бережневой Зои Александровны на тему «Роль генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при абиотическом стрессе», представленную в диссертационный совет 24.2.479.01, созданного на базе ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий», на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений

Актуальность работы

Растения регулярно испытывают стрессовые воздействия, что негативно сказывается на параметрах их роста и продукционного процесса. Понимание механизмов адаптации растений к стрессовым воздействиям позволяет создавать линии, устойчивые к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Это имеет большое практическое значение для сельского хозяйства и селекции. Для нашей страны особо актуальным является создание растений устойчивых к низким положительным температурам и тяжелым металлам. Данный факт подтверждает актуальность данного диссертационного исследования.

Научная новизна

Создание генетически модифицированных растений, с целью придания им устойчивости к стрессовым условиям является стандартной процедурой. Однако для модификации обычно используют гены, кодирующие ферменты антиоксидантной системы или этапов синтеза низкомолекулярных антиоксидантов, которые напрямую вовлечены в формирование устойчивости.

Гены экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз на прямую не участвуют в ответе растений на стрессовые воздействия. Изучение их опосредованного влияния на формирование устойчивости растений является новым, не стандартным и интересным направлением исследований.

Кроме того, исследования чаще всего сосредоточены на изучении надземной массы растения. Работы на корнях встречаются реже, что также показывает новизну и актуальность данной работы.

Характеристика содержания работы

Работа построена по традиционному принципу, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованных источников.

Во введении автор обосновывает актуальность исследования, показывает научную новизну и практическую значимость, ставит цели и задачи исследования.

Обзор литературы состоит из нескольких параграфов, в которых дается описание анатомии, морфологии и функций корня; механизмах регуляции роста корня при действии стрессовых факторов; фитогормональной регуляции роста корня; генетической регуляции роста корня в норме и при действии стрессоров; росте корня при засолении, гипотермии, действии тяжелых металлов; роли экспансинов и ксиланэцеллюляз в норме и при действии стрессоров.

Раздел, посвященный строению и функциям корня, содержит общеизвестные факты, что подтверждается ссылками на учебники, а не на научные статьи и монографии. Таким образом, данный раздел является избыточным и не играет роли в понимании сущности диссертационной работы. Разделы, посвященные генетической регуляции роста, роли экспансинов, наоборот можно было расширить и снабдить схемами. В обзоре литературы отсутствуют иллюстрации, которые могли облегчить понимание материала.

На стр. 24 идет речь о концепции кислого роста, при этом автор указывает, что данная концепция описывает не все экспериментальные данные и требует дальнейшего изучения, однако дает ссылку на работу Schorfer, 1985. Возникает вопрос, как продвинулись работы в данном направлении за прошедшие 40 лет?

В параграфе 1.3.3. на стр. 38 автор говорит о поглощении кадмия посредством метаболического пути. Что за метаболический путь подразумевается? Также, ниже, говорится о том, что кадмий в низких концентрациях может стимулировать рост побегов и корнеобразование, но не указано, что понимается под низкими концентрациями.

Глава 2 – материалы и методы исследования написана чересчур подробно и сопоставима по объему с обзором литературы. Считаю несколько избыточным подробное описание стандартных, общепринятых методик и протоколов приготовления реактивов для них. Излишняя подробность описания методик сопровождается рядом неточностей в них. Например, на с. 56 описывается приготовление реактива Бредфорда, дается описание объемов всех компонентов, но пропущена навеска основного компонента – красителя. На с. 57 описано приготовление 20% раствора ТХУ, при этом указывается какой объем кислоты необходимо взять, хотя вещество твердое и необходимо указывать массу.

Пункт 2.4. на с. 59 в значительной степени повторяется с пунктом 2.8. на с. 62 и 2.9. на с. 63 – и там и там дается описание выделения РНК, построение кДНК и постановки ПЦР. Также значительно пересекаются пункты 2.10 и 2.14, где описаны условия культивирования растений.

В противоположность другим разделам главы 2, дизайн исследования описан очень кратко.

Глава 3 – результаты исследования и их обсуждение. Параграф 3.1. – анализ содержания транскриптов исследуемых генов. Говорится, что проводили полуколичественную оценку уровня экспрессии транскриптов в побегах и корнях. Указано, что для дальнейшей работы взяты растения с повышенным содержанием транскриптов исследованных генов в корнях. При этом на рисунках показаны только ПЦР-продукты для генов в корнях. Нет сравнения уровня экспрессии транскриптов в надземных и подземных частях растения, сравнения уровня экспрессии гена между опытными растениями. Растения не ранжированы по уровню экспрессии. Во сколько раз отличается уровень экспрессии исследованных генов в надземной и подземной частях? А между разными линиями?

В параграфе 3.2.1. обосновывается выбор действующих доз стрессовых факторов, однако не дается подтверждения выбранных доз в виде графиков и таблиц, отражающих зависимость «доза - эффект». На чем основано предположение, что 50 мМ хлорида натрия активирует нативные гены EXPs и XTHs (с. 80)?

После подбора действующих концентраций была проведена морфометрия корней контрольных и трансгенных растений, подвергнутых стрессовому воздействию. Автор заявляет, что сверхэкспрессия *NtEXPA1* положительно влияет на темп роста корней (с. 80, рис. 3.3А), однако скорость роста корней не изучалась в работе. Верно говорить, о влиянии на общую длину корня или на прирост, но не на темп роста.

В рисунках 3.3. – 3.16. звездочкой (*) обозначены достоверные отличия. Но автор не указал – достоверные отличия от чего? От контрольного варианта в данных условиях эксперимента или отличия для одной и той же линии, но в нормальных условиях и стрессовых? Сразу возникает вопрос – вызывали ли изменения в размере корней воздействия 50 и 100 мМ NaCl, в сравнении с контрольными условиями? – судя по гистограммам, как в нормальных, так и в «стрессовых» условиях прирост корней контрольных растений был примерно одинаков и составлял 4-5 мм. Возможно, более удачным было компоновать на один рисунок все условия эксперимента, тогда бы была более очевидна зависимость «доза - эффект».

На с. 98 автор поясняет выбор объекта для микроскопических исследований – линия 15 с геном *NtEXPA1* и линия 49 с геном *NtEXPA5*, обосновывая это тем, что «все исследованные экспансины работали в корнях примерно одинаково» - на чем основано это утверждение?

На с. 101 сказано, что не было существенных изменений в толщине клеточной стенки у исследованных вариантов. На основании чего сделано такое предположение? В работе не приведены численные характеристики толщины клеточных стенок.

В разделе 3.4. на одном рисунке изображены значения активности ферментов в растениях в норме и при действии стрессовых факторов. При этом одинаковой буквой обозначены статистически не различающиеся варианты. Это относится только к одному варианту опыта (норма / контроль) или ко всему рисунку? – например на рисунке 3.22Б в нормальных условиях (активность около 50 ед.) и при действии ацетата кадмия (порядка 150 ед.), для растений с геном *PtrXTH1*, значения помечены одной буквой, т.е. как не различающиеся, а в стрессе растение *NtEXGT* имеет активность порядка 50 ед., но отмечен другой буквой, т.е. как достоверно отличающиеся. Такая неоднозначность в обозначении достоверности различий затрудняет понимание и обсуждение текста раздела.

В обсуждении результатов, на стр. 127 дается ссылка на рисунок 3.33, однако такой рисунок в работе отсутствует, глава заканчивается рисунком 3.32, на который дается ссылка ранее.

В заключении и в выводах автор кратко резюмирует результаты своей работы.

Список использованных источников литературы обширный, однако, в нем, кроме научных трудов, встречаются учебники и учебные пособия. Также есть повторы одного и того же источника, например, очевидно, что источник 55 и 57 – один и тот же, повторное цитирование произведено с неправильной библиографической ссылкой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Испытанные в работе трансгенные растения табака могут быть использованы как модель для исследований функций экспансинов и ксилоглюканэндотрангликозилаз. Результаты исследования показывают возможность применения полученных генно-инженерных конструкций с генами *EXPs* и *XTHs* для создания трансгенных растений с улучшенным ростом корней и повышенной стрессоустойчивостью. Результаты могут быть полезны для биотехнологии, селекции и сельского хозяйства.

Достоверность и апробация полученных результатов

Работа прошла апробацию, что подтверждается тезисами докладов на многих научных конференциях различного уровня.

Качество представленных материалов подтверждается 5 публикациями в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК и международные базы WoS и Scopus.

Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой экспериментальных данных и сравнением их с имеющимися в научной литературе данными.

Вопросы и замечания

Вопросы и замечания были указаны выше, при обсуждении содержания работы. Позволим кратко повторить наиболее значимые из них:

Замечания:

1. В обзоре литературы можно не описывать строение и функции корня, которые являются общеизвестными. Данная часть обзора не влияет на понимание дальнейшего содержимого обзора и сути экспериментальной работы. Отсутствуют рисунки, схемы и таблицы.

2. Раздел с методами написан излишне подробно, при этом в описании методов есть неточности и недочеты, повторы, тогда как дизайн эксперимента описан поверхностно.

3. В результатах не всегда однозначно понятно, между какими вариантами показаны достоверные отличия.

4. Выбор опытных концентраций стрессоров и изучаемых трансгенных линий недостаточно обоснован.

5. В работе не проведено сравнение уровня экспрессии гена со степенью выраженности наблюдаемых морфологических и физиологических отличий.

Вопросы:

1. Что автор подразумевает, когда говорит о повышенном содержании транскриптов исследованных генов? Повышенных относительно чего? – экспрессии референсного гена в корне, экспрессии трансгена в корне относительно стебля или экспрессии в данной линии, относительно другой линии, с наименьшей экспрессией?

2. Можно ли выявить корреляцию между относительным уровнем экспрессии генов и приростом корней в норме и в условиях действия стрессовых факторов?


3. В заключении автор говорит, что полученные данные расширяют представление о взаимодействии компонентов клеточной стенки с антиоксидантной системой (АОС) корней. Что подразумевается под компонентами клеточной стенки? Каким образом полученные результаты говорят о взаимодействии АОС с компонентами клеточной стенки? – в работе не представлены данные об изменении в химическом составе компонентов клеточной стенки или её физических свойств. Не проведено разделения ферментов АОС на цитозольные и апопластные, ассоциированные с клеточной стенкой.

Заключение. Несмотря на выявленные недостатки, диссертационная работа Бережневой Зои Александровны «Роль генов экспансинов и ксилоглюканэндотрансгликозилаз в регуляции роста корней при абиотическом стрессе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений, по всем критериям отвечает требованиям,

установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в действующей редакции, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент, доцент кафедры экспериментальной биологии и биотехнологий Института естественных наук и математики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», кандидат биологических наук по специальности 03.01.05 – Физиология и биохимия растений (биологические науки), доцент

«02» мая 2024 г.

 Александр Анатольевич Ермошин

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

Адрес: 620002, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Мира, д. 19

тел.: 8(343) 389-97-28

e-mail: Alexander.Ermoshin@urfu.ru

Я, Ермошин Александр Анатольевич, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Бережневой Зои Александровны, и их дальнейшую обработку.

«02» мая 2024 г.

 Александр Анатольевич Ермошин



