

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Лобревой Ольги Викторовны

на тему: «Везикулярный транспорт H^+ -АТФазы Р-типа и ионов Na^+ при солевом стрессе у *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.»

по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений

Актуальность. Засоление почв является глобальной проблемой, остро стоящей во многих регионах мира. Согласно современным данным к настоящему времени 20–50% площадей сельскохозяйственного назначения характеризуются избыточным засолением, и площадь таких территорий постоянно увеличивается. Известно, что повышение содержания солей в почве вызывает у растений целый ряд серьезных изменений в физиологических процессах, приводящих к снижению их продуктивности. Однако некоторые виды (генотипы) обладают повышенной солеустойчивостью, в том числе за счет способности эффективно регулировать цитоплазматические концентрации Na^+ и Cl^- , поддерживая их в условиях солевого стресса на относительно низком уровне. В настоящее время большое внимание уделяется изучению молекулярно-генетических механизмов солеустойчивости растений, что важно с точки зрения возможного их использования в генной инженерии для повышения устойчивости к засолению культурных видов. В этой связи тема диссертационной работы О.В. Лобревой весьма актуальна и выполнена в рамках активно развивающегося направления экологической физиологии растений, связанного с изучением молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к стрессовым воздействиям.

Научная новизна и практическая значимость. Полученные в ходе исследований результаты имеют выраженную новизну. В частности, впервые показано, что у растений *Arabidopsis thaliana* в условиях солевого стресса белок флотиллин1 (Flot1) вовлечен в везикулярный транспорт H^+ -АТФазы Р-

типа. Помимо этого, впервые обнаружена стимуляция хлоридом натрия доставки этого фермента к плазмалемме за счет активизации экзоцитозного пути. Важен также вывод о том, что в поддержании необходимой концентрации Na^+ в цитоплазме участвуют содержащие Na^+ эндоцитозные везикулы, которые сливаются с вакуолями.

Результаты исследования имеют фундаментальный характер. Они расширяют представления о роли флотиллинов в везикулярном транспорте белков и ионов Na^+ , ремоделировании белкового состава мембран и поддержании ионного гомеостаза у растений в условиях солевого стресса. Сделанные в ходе выполнения работы заключения и выводы могут быть использованы при разработке и чтении курсов по физиологии растений, экологической физиологии растений и клеточной биологии для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации. Достоверность результатов и сформулированных выводов обеспечивается тщательной проработкой литературных источников по теме работы, логичной постановкой экспериментов, грамотным выбором методов исследования. Достоверность полученных данных доказана результатами статистической обработки. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 10 научных конференциях разного уровня. По теме диссертации опубликовано 5 статей в научных журналах, рекомендованных для защиты в МГУ, а также 11 тезисов в сборниках материалов конференций.

Структура диссертационной работы. Диссертация О.В. Лобревой имеет традиционную структуру. Она состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список использованных источников. Материалы диссертации изложены на 148 страницах и содержат 10 таблиц и 30 рисунков. Список цитируемой литературы включает 267 источников.

Во введении автор доказывает актуальность темы исследований, указывает цели и задачи работы, ее новизну, обозначает научную и практическую значимость исследования, обосновывает положения, выносимые на защиту.

В первой главе представлен литературный обзор. В нем, в частности, указываются общие современные представления о везикулярном транспорте у эукариот, приводятся доказательства важной роли эндоцитоза и экзоцитоза в ряде важных физиологических процессов у растений, в том числе в их адаптации к стрессовым воздействиям; перечисляются типы эндосом и указывается их роль в транспорте веществ; подробно описаны белки и белковые комплексы, участвующие в регуляции везикулярного транспорта. Дается характеристика белков флотиллинов, указывается их роль в растительном организме. Значительная часть обзора литературы посвящена структуре и функциям H^+ -АТФазы Р-типа. Представлены косвенные свидетельства транспорта Na^+ везикулами. Необходимо отметить также важность представленных в литературном обзоре сведений об индикаторах и ингибиторах, использовавшихся в работе. Небольшое замечание к этому разделу заключается в недостаточно четкой формулировке того, что неизвестно в данной области знаний.

Вторая глава посвящена описанию объектов исследования, материалов и методов исследования, указан метод статистической обработки полученных результатов.

В третьей главе описываются полученные в ходе исследования результаты. В подглаве 3.1. представлены данные, касающиеся выявления участия белка мембранных нанодоменов AtFlot1 в везикулярном транспорте H^+ -АТФазы Р-типа у растений *A. thaliana* в условиях солевого стресса. Использование большого числа разнообразных методов (метод ПЦР и количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме РВ, иммуноблот-анализ, трансмиссионная электронная микроскопия) позволило автору получить новые интересные данные. В частности, выявить, что содержание в плазмалемме H^+ -АТФазы определяется балансом экзоцитозного, эндоцитозного и вакуолярного путей

везикулярного транспорта, а также доказать вовлечение в эти пути белка Flot1, локализованного в мембранных нанодоменах.

Вопросы к подглаве 3.1. 1. В представленных результатах обращает на себя внимание гораздо более высокое содержание H^+ -АТФазы в плазмалемме клеток листьев по сравнению с корнями у нокаутированного мутанта по гену *AtFlot1*, при этом у ДК и мутанта с повышенной экспрессией этого гена такого не наблюдается. Имеет ли это какое-либо физиологическое значение для растений с отключенным геном белка Flot1?

2. На основании полученных данных (подглава 3.1.1.5) автор высказывает предположение, что изменения в содержании H^+ -АТФазы в плазмалемме в ответ на действие NaCl могут быть обусловлены NaCl-индуцированными изменениями в экспрессии генов H^+ -АТФазы. Однако достоверных различий в экспрессии генов обеих изоформ H^+ -АТФазы между растениями, испытывающими засоление и растениями, находящимися в контрольных условиях, не обнаружено. Имеется ли в этом случае основание для высказывания такого предположения?

Глава 3.2. посвящена изучению переноса ионов натрия эндоцитозными везикулами клеток суспензионной культуры *A. thaliana*. С помощью эпифлуоресцентного микроскопа автором получены качественные снимки локализации эндоцитозного флуоресцентного маркера FM 4-64 и Na^+ -индикатора ANG-2 TMA в клетках растений. Было обнаружено повышение интенсивности флуоресценции маркера и индикатора в ходе инкубации клеток с NaCl. Эксперименты с помощью конфокальной микроскопии по совместной локализации двух зондов выявили важный факт, что Na^+ , наряду с ионными каналами и транспортерами, проникал в клетки посредством эндоцитоза. Для получения дополнительного представления о транспорте Na^+ эндоцитозными везикулами клеток *A. thaliana* автором изучена их ультраструктура при ответе клеток на засоление, что, безусловно, повысило научную значимость работы. В частности, представлены результаты, позволяющие говорить об усилении вакуолизации цитоплазмы при действии хлорида натрия, что проявляется уже

через 5 мин воздействия соли. Проведенные исследования позволили сделать важный, на мой взгляд, вывод о везикулярном транспорте Na^+ в вакуоли, что, вероятно, является более энергетически выгодным путем, по сравнению с его поступлением через ионные каналы и транспортеры, и может быть одним из важных механизмов защиты цитоплазмы от избыточных количеств ионов натрия.

В заключении автор обобщает полученные результаты и обосновывает сделанные выводы и предположения. В частности, автор указывает на участие белков флотиллинов в механизмах устойчивости растений к засолению и обращает внимание на тот факт, что у нокаутированного по этому гену мутанта возможны альтернативные пути везикулярного транспорта. Доказан также перенос везикулами ионов натрия, что направлено на защиту клеток от его избыточных количеств. Обнаружено участие везикулярного транспорта в изменении в условиях засоления количественного и качественного состава мембран.

Вопросы и замечания к разделу Заключение. 1. Можно ли указать более конкретно, какие альтернативные пути везикулярного транспорта имеют место у нокаутированного мутанта?

2. На мой взгляд в заключении не хватает анализа выявленных различий между корнем и побегом, которые отчетливо прослеживаются по многим показателям и, вероятно, могут иметь определенное значение для повышения солеустойчивости растений.

Заключение. В целом, необходимо отметить общее положительное впечатление от работы. Диссертация выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных методов исследования. Она логично выстроена, написана хорошим научным языком. Положения, выносимые на защиту, а также выводы, сделанные в ходе работы, обоснованы. Все поставленные задачи выполнены. Заданные вопросы и высказанные замечания имеют в значительной степени уточняющий характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Сама диссертация и автореферат хорошо

иллюстрированы. Автореферат соответствует диссертации. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационная работа оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лобрева Ольга Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 Физиология и биохимия растений (по биологическим наукам).

Официальный оппонент:
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории экологической
физиологии растений Института биологии – обособленного подразделения Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН),
зам.директора по научной работе ИБ КарНЦ РАН

Казнина Наталья Мстиславовна

31.01.2025

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: _____

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Адрес места работы:

185910, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11;

тел. _____, e-mail: _____