

**Отзыв официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**доктора биологических наук Василия Витальевича Птушенко**  
**на тему: «Фотозащита кислородных фототрофных организмов при действии**  
**стрессовых факторов различной природы»**  
**по специальностям 1.5.2. Биофизика**  
**и 1.5.21. Физиология и биохимия растений**

За последние годы в исследованиях фотосинтеза и в фотобиологии в целом резко возрос интерес к фотозащитным реакциям фотосинтетического аппарата, прежде всего его пигментной части, возникающим у растений в ответ на изменение световых условий обитания и иные стрессорные воздействия. Сложность изучения подобных фотозащитных реакций заключается в их множественности, протекании в разные временные интервалы с реализацией разных биофизических и биохимических механизмов, а также их вариабельности в разных растительных таксонах. Исследования в данной области, проводимые диссертантом, В.В. Птушенко, следует признать высокоактуальными. В работе поставлены важные взаимосвязанные задачи. Это 1) выявление роли совокупности фотозащитных механизмов; 2) влияние экологических факторов; 3) сроки развития фотозащитных реакций; 4) влияние интенсивности и спектрального состава света на защитные реакции

Диссертация изложена на более чем двухстах страницах печатного текста, содержит 9 таблиц, 90 схем и рисунков. Работа состоит из введения, где дается обзор современного состояния научной проблемы, соответствующей проблематике диссертации, и 9 глав. Первая из них содержит обзор литературы с изложением сведений об известных на сегодня механизмах фотозащиты растений, начиная с нефотохимического тушения в пигментном аппарате и заканчивая адаптациями на уровне целого многоклеточного растения. Во второй главе коротко рассматриваются



объекты исследования, которыми служили различные филы оксигенных фотосинтетиков, включая зеленые микроводоросли, лишайники, мхи, голо- и покрытосеменные растения. Здесь также описываются примененные измерительные биофизические методы исследования, где наиболее значительное внимание уделено флуоресцентным методикам, а также физиолого-биохимическим и ряду иных подходов. Главы 3-8 посвящены конкретным экспериментальным исследованиям. Глава 9 содержит заключение и выводы. Имеются также приложение, посвященное изложению выполненных расчетов диэлектрических свойств белков, и список литературы из 265 источников.

В Главе 3, первой из экспериментальных глав, изложены весьма интересные данные, свидетельствующие о влиянии температурного фактора с охлаждением вплоть до 0 °С клеток зеленой микроводоросли *Lobosphaera incisa*. Показано, что охлаждение, очевидно, вызывающее торможение биохимических процессов клетки, приводит к индукции нефотохимического тушения (НФТ) в пигментном аппарате параллельно с ростом экспрессии генов защитных белков PsbS и LhcSR. При этом для быстрых световых защитных реакций впервые удалось показать, что увеличенная экспрессия продолжается в течение ряда суток. При этом на основе полученных сведений о мРНК белка PsbS была предложена его аминокислотная последовательность и построена трехмерная компьютерная белковая структура. Кроме того, удалось показать, что несмотря на различие аминокислотного состава с белком цветковых растений пространственное строение этих белков очень близко, что служит подтверждением их одинаковых светозащитных функций.

В главе 4 собран большой и разнообразный экспериментальный материал по изучению активности ФС 2 и степени развития НФТ (энергетическое рН-зависимое и зеаксантин-зависимое НФТ) у тене- и световыносливых видов традесканций, из которых основными выбраны два вида, *T. fluminensis*, и *T. sillamontana*. Данные касаются также различий в



устыичной проводимости, трансмембранных значений рН, размеров мезофилла, числа и размеров хлоропластов в листьях. При этом, что важно, перемещение хлоропластов и НФТ как светозащитные реакции рассматриваются совместно. Такой комплексный подход, в общем, не встречается в других работах. Однако *T. fluminensis* имеет обычные черешковые листья, а *T. sillamontana* – ксерофитный листовой суккулент со значительным запасом воды в листовой пластинке и опушёнными листьями. Поэтому светорассеяние и локальная температура мезофилла у двух видов в одних и тех же условиях могут сильно различаться. Возможно, корректнее было бы сравнивать не два вида из рода традесканция, а два разных рода суккулентов, тем более что фотосинтетические характеристики суккулентов, насколько известно, почти не изучены. Кроме того, полученные данные о том, что у традесканций внутриклеточное перемещение хлоропластов изменяет светопоглощение в 2-4 раза, не коррелирует с данными ряда других исследований о том, что эта величина у разных видов не превышает 10-20%. Возможно, тут необходимы дополнительные измерения.

Глава 5 посвящена экспериментальному доказательству эффективности в фотосинтезе желто-зеленого спектрального диапазона на примере листьев китайской капусты. Такой свет действительно дает прибавку в фотосинтезе нижнего слоя хлоренхимы у листьев с большим содержанием хлорофилла за счет интенсивного светопоглощения в красной и синей области спектра. Эффект сравним с филогенетической световой адаптацией водорослей в океане. Из-за поглощения морской водой ИК-света и рассеяния УФ-света на глубину проникают преимущественно зеленые лучи, что сказывается на видовом составе и составе пигментов глубоководных водорослей в пользу зеленого света. Контрольным экспериментом в случае китайской капусты можно было бы рекомендовать опыт с перемешиваемой суспензией зеленых одноклеточных водорослей. При том же составе пигментов, что у наземных растений, перемешивание ликвидировало бы расслоение на нижний и верхний слои клеток и должно было бы убирать эффект зеленого света.



В главе 6 рассматривается работа ФСА при изменении газового состава среды, наличия в ней углекислого газа и  $O_2$ . Это огромный комплексный вопрос. Известно, что появление кислородного фотосинтеза изменило состав биосферы. Содержание двух газов,  $O_2$  и  $CO_2$ , в воздушной среде и растворимость в воде, важная для водных фотосинтетиков, сегодня различаются в десятки раз. Современные фотосинтетики испытывают нехватку  $CO_2$ , из-за чего существуют C4-растения и  $CO_2$ -концентрирующие биохимические механизмы. Растворимость  $CO_2$  значительно зависит от pH, при этом прекрасно существуют водоросли, живущие в водоемах при pH = 10, т.е. в щелочной среде, и водоросли-ацидофилы, обитающие в кислоте при pH = 1-2. Такие виды более всего зависят от активности карбоксилазы - фермента фиксации  $CO_2$ , от клеточного числа и активности митохондрий, их взаимодействия с хлоропластами. В частности, эксперименты с  $CO_2$  (водоросль *Desmodesmus* sp.) проводились диссертантом в весьма жестких условиях, когда уровень углекислого газа был поднят в 70 раз, от обычных 0.03 до 20%. Заслуга диссертанта заключается в получении ценных экспериментальных данных об активности фотосинтетического аппарата и проявлении фотозащитных реакций при разном содержании обоих газов, начиная с анаэробноза. В настоящее время подобные данные в мировой литературе, надо отметить, весьма скудны.

В главе 7 рассмотрена индукция светового стресса у хвойных и покрытосеменных древесных растений в природных условиях в зависимости от сезона, от загрязнений воздуха, а у зеленых микроводорослей - от проникающих (в клетку) антиоксидантов. Как и следовало предполагать, наиболее чувствительным к загрязнению параметром пигментного аппарата оказывается фотоактивность ФС 2. На наш взгляд, из полученных результатов наиболее интересны данные, связанные с осенним пожелтением листьев за счет деградаций хлорофилла и сохранения каротиноидов. Известно, что значительная доля каротиноидов растения не связана с пигментным аппаратом. Поэтому сведения о выделении хлоропластов из



листьев по мере пожелтения и измерение их фотоактивности могут выглядеть как интересная перспектива развития подобных экспериментов.

Последняя экспериментальная глава 8 посвящена нефотохимическому тушению флуоресценции и устойчивости пигментного аппарата к стрессам у листостебельного мха *Physcomitrella patens* и трехкомпонентного листоватого лишайника *Peltigera aphthosa*. Представляется, что постановку эксперимента с мацерацией протонемы лишайника ферментом драйзелазой для имитации высушивания нельзя считать оптимальной. Как следует из Таблицы 8.1, содержание в хлоропластах основных белков ФС 2 при этом падает в 6-12 раз, а белков ФС 1 даже в 36-37 раз. Скорее, это может объясняться происходящим интенсивным автолизом или даже разрушением хлоропластов.

Трехкомпонентный лишайник *P. aphthosa* содержит в своем составе одновременно и цианобактерию, и зеленую водоросль. Благодаря поверхностному расположению клеток цианобактерии лишайник даже имеет голубоватый цвет. Поэтому предпринятое измерение индукции флуоресценции и нефотохимического тушения в слоевище является измерением флуоресцентных параметров сразу у двух разных фотосинтетиков. Возможно, мягкое удаление цианобактерий с поверхности их деликатным смыванием помогло бы решить проблему.

Список литературы достаточно обширен. Учитывая разнообразие использованных методов исследования и обилие объектов, начиная с микроводорослей и заканчивая древесными формами покрытосеменных, диссертанту, по-видимому, пришлось ограничить себя в выборе цитирований, чтобы их число не выглядело слишком объемным. Тем не менее, хотелось бы высказать несколько замечаний. Если в списке нашлось место для научно-популярной работы Джадда Д. и Вышецки Г. «Цвет в науке и технике» (1971), то целесообразно было бы упомянуть и книгу М. Миннарта «Цвет и свет в природе» (1959 или 1969), где даются примеры разнообразия световых условий, в которых существуют растения. Главы,



касающиеся зеленых водорослей и особенно мхов и лишайников как объектов менее знакомых большинству ученых-фотосинтетиков, хорошо было бы предварить ссылками на соответствующие физиолого-ботанические обзоры последних лет, опубликованные, как и обзоры, касающиеся общих функций каротиноидов, в достаточном числе в российских журналах. Такие работы как статья Лоури по электрофорезу за 1951 г. можно было бы исключить. Если цитируется работа Бёма за 1856 г., о хлорофилле, то работу А.С. Фаминцына и О.В. Баранецкого, за 1867 г., обнаруживших зеленые микроводоросли в составе лишайников и тем самым их симбионтную природу, следовало бы, конечно, упомянуть. Кроме того, диссертация в значительной своей части посвящена защитной фотореакции — нефотохимическому тушению. Поэтому отсутствие ссылки на публикацию 1957 г. первооткрывателей виолоксантинового цикла Д.И. Сапожникова и соавт. в Докладах АН СССР выглядит досадным упущением.

Диссертант в тексте использует термин «высшие растения» вместо «покрытосеменные» или «цветковые». Цветковые действительно принадлежат к кладе высших растений, а все растения подразделяются на две клады, или подцарства, высшие и низшие. В устоявшейся ботанической и физиологической терминологии к низшим относятся только водоросли и лишайники. Все остальные группы (мхи, хвощи, плауны, папоротники, голо- и покрытосеменные есть высшие растения). Если бы в диссертации рассматривались только цветковые, это бы не имело особого значения, но так как среди объектов исследования находятся также мхи, лишайники и хвойные, то неточная терминология создает некоторые затруднения в тексте обобщающих глав диссертации. Аналогично, упоминаемых на страницах «низших и высших сосудистых растений» не бывает, так как к сосудистым относятся только высшие растения за исключением мхов.

Ряд сделанных замечаний не умаляют достоинств проведенной большой экспериментальной работы, теоретических обобщений и достигнутых результатов. Ценность исследования заключается в осуществлении



комплексного подхода к проблеме фотозащиты растений с учетом разнообразия ботанических таксонов, морфологических растительных форм и обилия защитных реакций, выработанных в ходе эволюции фотосинтеза. Теоретическое значение работы заключается в том, что подобные исследования приближают построение единой теории защиты растений различных систематических групп и прежде всего их фотосинтетического аппарата от повреждающего действия избыточного света. Кроме прямого стрессового действия света в проведенном исследовании выясняется степень отрицательного воздействия на растение в случае сочетания света с другими стрессовыми факторами. Практическое значение работы в перспективе весьма велико. Оно ведет к лучшему пониманию возможностей сельскохозяйственных культур в повышении урожайности и к лучшему использованию разнообразных географических и экологических условий, используемых для их выращивания. Также важным представляется применение результатов работы для оценок возможностей сохранения растительных биотопов дикой природы. Не исключено использование полученных результатов для более успешного создания систем искусственного фотосинтеза.

Учитывая актуальность, новизну, объем и высокий научный уровень проведенного исследования, можно заключить, что рассматриваемая диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к диссертациям, представленным на соискание степени доктора наук. Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.21. Физиология и биохимия растений (биол. науки) и критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова с оформлением согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Птушенко Василий Витальевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.2. Биофизика и 1.5.21. Физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспрессии генома растений Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН Стадничук Игорь Николаевич

Контактные данные:

тел.: +7(499) 678-54-00; e-mail: ifr@ippras.ru

Доктор биологических наук по специальности 03.00.04, Биохимия

И.Н. Стадничук

Адрес места работы:

127276, Москва, ул. Ботаническая, 35

тел.: +7(499) 678-54-00, e-mail: ifr@ippras.ru

Подпись сотрудника Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН Стадничука И.Н. у

ПОДП  
ЗАВЕД  
ОТД. КА