

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Елены Викторовны Жмудь «Активность ингибиторов трипсина у представителей родов *Hedysarum* L. и *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.) в Южной Сибири»**, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.01 – Ботаника

Одной из актуальных проблем современной ботаники является изучение потенциала перспективных для практического использования видов растений. Эти исследования способствуют выявлению биологических характеристик, которые лежат в основе адаптации видов к определенным условиям окружающей среды. Адаптации у растений проявляются как изменения морфоструктурных признаков, однако в основе этих изменений нередко лежат определенные вещества, способствующие этим изменениям и повышению устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Классические эколого-биологические исследования растений, как правило, включают изучение их морфоструктурных особенностей в различных эколого-географических условиях. И пока очень мало работ, которые бы связывали изменения, происходящие на морфологическом уровне с глубинными причинами, вызывающими эти изменения. Поэтому поставленную автором рассматриваемой диссертации цель выявления изменчивости одного из факторов иммунитета – активности ингибиторов трипсина в связи с изменением комплекса морфобиологических признаков, имеющих адаптивное значение у некоторых видов семейства Бобовых следует признать весьма актуальной.

Представленная диссертация является результатом многолетней научной работы автора по комплексному изучению морфоструктурных особенностей ряда видов *Hedysarum* L. и *Astragalus* L. и активности содержащихся в них ингибиторов трипсина. Е.В. Жмудь выполнен большой объем разноплановых исследований, требующих обширных познаний в морфологии, популяционной биологии и, отчасти, – в биохимии и физиологии растений. Основой для работы послужили материалы, собранные в ходе маршрутных и стационарных исследований на территории Южной Сибири – в Алтайском крае, Республиках Алтай, Хакасия, Бурятия, в Иркутской области и Забайкальском крае. Кроме того, в исследования вовлечены растения, выращиваемые в течение многих лет в Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (Новосибирск) и в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета (Томск).

В результате работы впервые у нескольких видов *Hedysarum* и *Astragalus* выявлено изменение активности водорастворимых ингибиторов трипсина (ИТ), показаны изменение активности при искусственной дефолиации и роль ингибиторов трипсина в ответе на стрессовые воздействия, изучены внутривидовая изменчивость активности ИТ и морфологических признаков у 2 модельных видов *Hedysarum* и 2 видов *Astragalus* в широком диапазоне эколого-ценотических условий, охарактеризованы корреляционные связи; на примере видов с широким экологическим диапазоном показана изменчивость морфологических признаков и активности ингибиторов трипсина (АИТ) с изменением высоты над уровнем моря, выявлена ценотическая приуроченность видов и ценопопуляций растений с отличающимися значениями АИТ.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы, списка сокращений, перечня терминов, списка иллюстраций и 12 приложений; основной текст изложен на 342 страницах, включает 60 иллюстраций (фотографии, диаграммы, графики) и 26 таблиц. В работе использовано 482 литературных источника, из них 248 иностранных.

Диссертацию открывает глава 1, посвященная обзору имеющейся литературы по теме исследования. Глава объемная, занимает 52 страницы и затрагивает все вопросы, о

которых идет речь в диссертации. Показано, что, несмотря на многообразие изученных к настоящему времени факторов иммунитета, активность водорастворимых ингибиторов трипсина изучена у покрытосеменных, в основном, в состоянии покоя, а именно, в запасающих тканях растений – семенах, клубнях и т.д. Охарактеризована роль ингибиторов протеиназ (в том числе – ингибиторов трипсина) в подавлении их активности, приведены многочисленные примеры использования этой группы белков в практических целях, например в медицине, и использования растений с высокой трипсинингибирующей активностью в качестве источников генов устойчивости к патогенам и вредителям. Значительное место в главе отведено дискуссии об изменчивости и пластичности, причем автор выражает собственное мнение по этому вопросу. *Правда, здесь обнаруживается некоторое несоответствие. Сначала автор пишет: «Мы считаем, что пластичность признаков растений – это частный случай их изменчивости» (с. 41), а через несколько строчек видим следующее: «В данной работе мы разделяем точку зрения Ю.А. Злобина (1989), согласно которой от изменчивости растений следует отличать их пластичность» (с. 41).* Но в целом дискуссия и ее обсуждение автором вызывают интерес и заставляют задуматься об этих свойствах растений. Исходя из литературных данных, автор делает вывод об актуальности решения проблем, связанных с изучением изменчивости АИТ в процессе роста и развития растений, в разных эколого-ценотических условиях, при индуцированных стрессовых воздействиях и др.

Глава 2 посвящена методам, которые Е.В. Жмудь использовала для достижения цели и решения задач, поставленных в работе. В первую очередь приведено обоснование выбора объектов исследования – модельных видов. Согласно литературным данным, именно у представителей семейства Бобовых активность ингибиторов трипсина весьма высока. Для изучения выбраны лесостепные виды с широкой экологической амплитудой (*Astragalus austrosibiricus*, *A. propinguus*, *Hedysarum gmelinii*), эндемики (*A. sericeocanus* и *H. austrosibiricum*) и редкий для Сибири *H. theinum*. На основе уже известных методов исследования активности ингибиторов трипсина в семенах Бобовых, автором модифицирована и успешно применена методика определения уровня активности этой группы веществ в высушенных листьях. Это позволило целенаправленно осуществлять сбор материала для анализа в природе у живых растений и затем исследовать ферментативную активность в лабораторных условиях. В целом автором освоены и применены популяционно-онтогенетические, биохимические методы, поставлен оригинальный эксперимент по изучению АИТ при стрессовом воздействии в форме искусственной дефолиации. Морфометрические показатели обработаны методами статистики, включая многомерную, проведен корреляционный анализ признаков; согласно методике Н.С. Ростовской (2002), выявлены индикаторные группы признаков, определена регрессия признаков на высотном градиенте. Большое число обследованных ценопопуляций, размер выборок для анализа морфометрических показателей позволяют сделать вывод о достоверности полученных результатов.

Замечания по главе:

1. Непонятно, проводилась ли проверка распределения признаков (нормальное, асимметрия); применение критерия Стьюдента предполагает нормальное распределение.

2. На с. 79 главы 2 написано, что изменчивость АИТ изучена в 36 ценопопуляциях *Hedysarum gmelinii*, 9 ЦП *H. austrosibiricum*, 17 ЦП *Astragalus mongholicus* и 32 ЦП *A. austrosibiricus* (всего 94). В той же главе на с. 82 снова видим перечисления числа ЦП, в которых изучалась АИТ, но здесь уже указано 18 ЦП *Astragalus mongholicus* и 34 ЦП *A. austrosibiricus* (всего ЦП *Hedysarum* и *Astragalus* – 96).

Главы 3–5 посвящены представлению и обсуждению результатов собственных исследований и доказательствам положений, выносимых на защиту. Ниже представлена характеристика этих глав, замечания высказаны после их обзора.

В главе 3 изложены результаты, доказывающие защищаемые положения 1 и 2. Автором впервые проведены подробные исследования активности ингибиторов трипсина у видов двух родов – *Astragalus* и *Hedysarum*, ее межвидовой и внутривидовой изменчивости, годичной и сезонной динамики, изменчивости у разновозрастных особей в культуре и особей разных онтогенетических состояний в естественных ценопопуляциях. В результате исследований выявлено, что виды рода *Hedysarum* характеризуются в десятки раз большей трипсинингибирующей активностью, чем виды *Astragalus*. Не выявлено закономерностей в годичной и сезонной динамике АИТ, а именно: диапазон значений активности в разные годы в одном и том же местообитании может отличаться в несколько раз, а максимум в среднем приходится на фазу цветения или бутонизации. В результате сопоставления с погодными условиями лет исследования Е.В. Жмудь сделан вывод о том, что отличия обусловлены воздействием погодных условий в разные вегетационные периоды. Тем самым доказано положение о том, что наибольшая активность ингибиторов трипсина характерна для видов *Hedysarum*, наименьшая – для видов *Astragalus*, а годичная и сезонная динамика отражают участие этой группы веществ в адаптациях растений в различных эколого-географических условиях. Различий трипсинингибирующей активности не выявлено у разновозрастных особей и особей разных стадий онтогенеза, и это постоянство, по мнению автора, способствует устойчивости генеративных растений.

Известное по литературным данным увеличение активности ингибиторов трипсина в ответных реакциях на патогенез и выявленная автором более высокая активность АИТ у видов *Hedysarum*, как в целом, так и в ответ на стрессовые воздействия погодных условий, послужили основанием для проведения оригинального эксперимента по искусственной дефолиации побегов и наблюдений за активностью ИТ у 3 видов рода – редкого *Hedysarum theinum*, эндемичного *H. austrosibiricum* и полиморфного *H. gmelinii*. Проведение эксперимента и полученные экспериментальные данные доказывают второе защищаемое положение. Искусственная дефолиация моделирует стрессовые воздействия, наблюдающиеся при скусывании скотом и сборе сырья. У одного вида – *H. theinum* – наблюдалось увеличение активности ИТ в первые минуты после удаления первого листа в фазах бутонизации и плодоношения, причем в неповрежденных листьях, что указывает на ответную реакцию растения. При проведении эксперимента в фазе цветения повышения активности ИТ не обнаружено. Полученные автором результаты позволяют обосновать рекомендации по использованию видов в качестве пастбищных именно в фазе цветения, так как при выпасе в этой фазе сезонного развития значительного ухудшения кормовых свойств растений, а именно – увеличения АИТ не происходит.

Последний раздел главы посвящен инактивации ингибиторов трипсина. Инактивация ИТ имеет большое значение, поскольку кормовое использование растений, содержащих ингибиторы трипсина, возможно только после их инактивации. Автором проведены эксперименты по инактивации и установлено, что она достигается посредством тепловой обработки сухой надземной части. Кроме того, в предыдущих разделах главы показано, что уменьшение активности ИТ может быть достигнуто использованием растений в фазах сезонного развития с минимальным значением активности ИТ или отбором форм с низкой активностью ИТ.

Главы 4 и 5 построены по одному плану, а приведенные в них результаты доказывают третье защищаемое положение. В главах 4 и 5 рассматриваются изменчивость морфологических признаков и активность ингибиторов трипсина у видов *Hedysarum* (глава 4) и *Astragalus* (глава 5) в разных условиях среды. Решение этой задачи основано на наблюдениях за изменчивостью морфоструктурных признаков побегов, в высотном

градиенте в горных условиях. Известно, что у растений при увеличении высоты над уровнем моря изменяются некоторые количественные характеристики морфологических признаков, и эти изменения имеют адаптивное значение. Основой для сравнительного анализа количественных показателей морфоструктуры побегов и значений трипсинингибирующей активности послужили данные, полученные в естественных ценопопуляциях, находящихся в разных экологических условиях в пределах гор Южной Сибири, обработанные адекватными статистическими методами. Автором проведен сравнительный анализ изменчивости и пластичности количественных характеристик морфоструктуры побегов и значений АИТ у 4 видов из двух родов (2 вида *Hedysarum* и 2 вида *Astragalus*) в разном высотном диапазоне. В результате впервые доказано, что единственным общим для всех изученных видов *Hedysarum* и *Astragalus* изменением в высотном градиенте является миниатюризация особей в высокогорьях, обусловленная у большинства видов уменьшением числа метамеров побегов. Остальные признаки, реагирующие на повышение высоты местообитаний у разных видов разные. Кроме того для каждого из 4 изученных видов выявлены корреляционные взаимосвязи между морфометрическими показателями, установлены детерминированные признаки и признаки-экологические индикаторы, выявлен комплекс морфологических признаков (для каждого вида свой), которые позволяют растениям адаптироваться к условиям высокогорий. Кроме того, проведен сопряженный анализ морфометрических показателей и значений АИТ, сделан вполне обоснованный вывод о том, что у изученных видов трипсинингибирующая активность не коррелирует с морфологическими признаками и не подвергается существенным изменениям при увеличении абсолютной высоты их местообитаний. Методическое значение проведенных исследований заключается в предложении оценивать изменчивость и пластичность уровнем регрессии, который выбран эмпирически. Выявленная автором относительная независимость изменения значений трипсинингибирующей активности от влияния комплекса условий среды в высокогорьях является новым интересным фактом, способствующим расширению представлений об адаптивной роли этого фактора иммунной системы у растений.

Кроме уже высказанных, считаю нужным сделать следующие замечания по диссертации.

1. Автором при обсуждении изменения значений количественных показателей при увеличении абсолютной высоты местообитания используется только регрессия – показатель линейной связи признаков с факторами среды. Неясно, почему был выбран именно этот вид зависимости.

2. Из текста работы не вполне ясен критерий выбора значения коэффициента регрессии, равного 0.1, при превышении которого регрессия считается достоверной. Целесообразно было бы дать пояснения в методическом разделе работы.

3. В работе имеются стилистические погрешности, например: «вид несет в себе мезоморфные и ксероморфные черты» (с. 161), «определены жизненные формы сибирских представителей ВИДА» (что такое представители вида?) (с. 161); «большинство изученных морфологических ПРИЗНАКОВ *H. gmelinii* ... уменьшаются с увеличением высоты ИХ произрастания» (чьего произрастания?) (с. 175) и т.д.

4. В заголовке таблицы 10 (с. 171) не стоило бы помещать объяснение обозначения колонок, а вынести эту информацию в Примечания.

5. На с. 172 имеется 2 противоположных утверждения: «У растений *H. gmelinii* при подъеме в горы выявлен один пластичный морфологический признак – сокращение длины осевых побегов в среднем в 2 раза», через одно предложение читаем: «В меньшей степени при увеличении абсолютной высоты укорачиваются побеги и соцветия». Какие побеги имеются в виду?

6. На самом ли деле у модельных видов, в частности, у *H. gmelinii* удлинение побегов происходит за счет интеркалярного роста, неполной реализацией которого автор объясняет уменьшение длины побегов в высокогорьях? (с. 176).

7. Обобщения в конце глав и разделов лучше было бы назвать не «Выводами», а «Заключением по главе (или разделу)».

Оценивая диссертацию в целом необходимо отметить ту огромную работу, которую проделала Е.В. Жмудь при сборе, обработке, осмыслении материала. Сделанные замечания в основном редакционного плана и не снижают ценности диссертации, которая, помимо теоретического значения для разработки общих вопросов теоретической и прикладной ботаники, имеет большое практическое значение в части отбора форм с высокой активностью ингибиторов трипсина, как лекарственных растений, и с низкой – как кормовых. Автор диссертации является сложившимся исследователем, способным к постановке сложных задач и теоретическому осмыслению полученных результатов.

Автореферат и работы, опубликованные в таких авторитетных изданиях как «Ботанический журнал», «Растительные ресурсы», «Сибирский экологический журнал» отражают содержание диссертации, выводы отвечают поставленным задачам.

Считаю, что диссертацию «Активность ингибиторов трипсина у представителей родов *Hedysarum* L. и *Astragalus* L. (Fabaceae Lindl.) в Южной Сибири», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук, следует квалифицировать как законченное научное исследование, вносящее существенный вклад в понимание природы иммунного статуса растений, механизмов их адаптации к условиям среды и ответа на стрессовые воздействия. На основании выполненных исследований ее автором разработаны теоретические и практические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области ботаники. Диссертация по актуальности, новизне, научной и практической значимости полученных результатов отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а её автор Елена Викторовна Жмудь заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.01 – Ботаника.

Доктор биологических наук (03.02.01–Ботаника),
профессор, заведующая Гербарием им. П.Н. Крылова,
профессор кафедры ботаники,
заслуженный работник высшей школы РФ

Гуреева Ирина Ивановна

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»
634050, г. Томск, проспект Ленина, 36,
Тел. (3822) 529585, <http://tsu.ru/>, rector@tsu.ru
Тел. (3822) 529794, <http://herbarium.tsu.ru/>, gureyeva@yandex.ru

28 сентября 2016 г.