

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу
Воронковой Марии Сергеевны «Вторичные метаболиты азиатских видов рода *Bistorta* (L.)
SCOP. (Polygonaceae) в связи с хемотаксономией и практическим использованием»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – «Ботаника»

Актуальность исследований. Исследования систематики целого ряда таксонов сложны и нуждаются в привлечении дополнительных методов. О большом значении хемосистематики при изучении сложных в систематическом отношении родов и видов отмечали ведущие ботаники (А.А. Федоров, М.Г. Пименов, П.Г. Горовой и др.). Стоит напомнить, что еще Н.И. Вавилов писал о необходимости всестороннего изучения видов, в том числе и биохимии. Однако выбор биохимических признаков – маркеров для целей хемосистематики определенных таксонов – весьма проблематичен. Как правило, маркерами являются вещества вторичного синтеза, отличающиеся большой мобильностью (например, фенольные соединения). С появлением современных методик хемотаксономия поднимается на новый уровень. Появилась возможность определять не только содержание веществ того или иного класса, но и углубленно изучать химический состав определенного таксона. Вопросы систематики сем. Polygonaceae, особенно родов *Bistorta* (L.) Scop., *Polygonum* s. str., *Persicaria*, которые ранее рассматривались в пределах одного рода (*Polygonum* L.), не являются окончательно решенными. До сих пор определение видов рода *Bistorta* вызывает затруднения. Специально хемотаксономические исследования рода *Bistorta* не проводились на территории Азиатской России. Актуальность работы М.С. Воронковой заключается еще и в том, что она провела исследования с использованием комплекса современных химических методик. Особенно важно изучение биохимических признаков видов *Bistorta* в целях применения в медицине. Таким образом, цель диссертационной работы М.С. Воронковой актуальна, а поставленные задачи направлены на достижение цели.

Научная новизна работы заключается в детальном изучении состава вторичных метаболитов представителей рода *Bistorta* Азиатской России и использовании полученных результатов в его систематике. Впервые современными методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведено хемосистематическое исследование представителей рода *Bistorta* Азиатской России. В качестве биохимических признаков были взяты фенольные соединения и сделано заключение о значимости качественных признаков как таксономических маркеров. Подтверждена самостоятельность видов *B. attenuata*, *B. elliptica*, *B. plumosa*, выявлены диагностические химические признаки для *B. officinalis*, *B. elliptica*, показана целесообразность выделения *B. vivipara* в отдельную секцию. Впервые проведены исследования на содержание вторичных метаболитов у 8 представителей рода *Bistorta* в Азиатской России. Впервые исследована индивидуальная и географическая изменчивость состава и содержания фенольных соединений и динамика накопления фенольных соединений в разные фенологические фазы. Изучены состав и содержание макро- и микроэлементов у двух видов – *B. attenuata* и *B. officinalis*. Впервые проведена оценка антиоксидантной активности экстрактов из надземных органов *B. officinalis*. Установлена антимикотическая активность экстракта из корневищ *B. officinalis* и эффективность его применения при лечении гингивита. Защищаемые положения диссертации вытекают из содержания работы и подтверждены полученными результатами.

Теоретическая и практическая значимость. Материалы диссертации могут быть использованы в таксономии рода *Bistorta* для разграничения близких видов. Данные по содержанию фенольных соединений, пектиновых веществ, каротиноидов, сапонинов у изученных видов дают представления о закономерностях содержания этих веществ в представителях рода *Bistorta* в Азиатской России. Исследования состава и содержания

фенольных соединений дали понимание индивидуальной и географической изменчивости этих химических веществ, а также распределения их по органам растений и в зависимости от фенофазы. Поэтому данные проделанной работы могут быть использованы для выявления географических районов, а также органов с высоким содержанием биологически активных веществ, и кроме того, для определения сроков заготовки растительного сырья. Корневища *B. officinalis* обладают противовоспалительными и антимикотическими свойствами и могут быть использованы в стоматологической практике, а также служить для прогноза применения видов в медицинской практике. Полученные данные по хемотаксономии могут быть включены в материалы учебного спецкурса «Ботаническое ресурсоведение».

Достоверность данных, представленных в работе не вызывает сомнения. Сбор образцов из природных популяций проведен лично автором, а также сотрудниками из разных ботанических институтов Сибири и Дальнего Востока. При этом охвачены практически все районы Азиатской России. Кроме того, использованы растения, культивированные на экспериментальном участке ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск). Индивидуальная изменчивость изучалась на образцах, собранных в одном местообитании в количестве не менее 15 (и до 50). В работе приведены результаты многолетних исследований (2010–2016). Автором выполнен основной объем исследований – разработка программы исследования, определение цели и задач, сбор материала, проведение экспериментов, обработка данных, анализ результатов и формулировка выводов. Часть научных публикаций выполнена в соавторстве. Все случаи использования результатов совместных исследований оговорены в соответствующих разделах диссертационной работы. Все результаты исследований подтверждены многочисленными биохимическими анализами, выполненными современными методами – высокоэффективной жидкостной хроматографии и спектрометрии и атомно-абсорбционной спектрометрии. Математическая обработка полученных данных проведена общепринятыми методами.

Краткая характеристика работы. Диссертация на 151 странице, иллюстрирована 27 рисунками и 23 таблицами. Она состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы (182 источников, в том числе, 87 на иностранном языке) и приложения, представленного на 9 страницах.

По объему, структуре построения и содержанию работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во **введении** автор обосновывает актуальность темы своего исследования, формулирует цель и задачи исследования, обращает внимание на новизну, теоретическую и практическую значимость работы. Сформулированы положения, выносимые на защиту, представлены сведения об апробации результатов исследования, публикациях автора, структуре и объеме диссертации, благодарностях.

В **первой главе** на основе литературных данных проведен систематический обзор рода *Bistorta* Азиатской России и дана морфологическая характеристика видов. В своей работе в понимании объема рода *Bistorta* автор придерживается точки зрения Н.Н. Цвелева (1989), которую он изложил в сводке «Сосудистые растения советского Дальнего Востока», а также автора обработки рода *Bistorta* во «Флоре Сибири» Н.Н. Тупицыной (1992).

Во **второй главе** приводятся объекты исследования. К ним относятся 7 видов из секции *Bistorta*: *B. officinalis*, *B. elliptica*, *B. plumosa*, *B. alopecuroides*, *B. attenuata*, *B. manshuriensis*, *B. pacifica* и 1 вид из секции – *Vivipara* – *B. vivipara*, что вполне правомерно. Описаны местообитания и даты сбора образцов для хемотаксономических исследований. Отмечено, что изменчивость фенольных соединений изучали на примере *B. officinalis*, *B. alopecuroides*, *B. elliptica*, *B. attenuata*, *B. vivipara*. Сезонную динамику содержания фенольных соединений изучали на образцах растений *B. officinalis* и *B. attenuata*, высаженных из природных популяций на территорию экспериментального участка ЦСБС СО РАН.

Большая часть второй главы диссертации – методическая. В ней подробно описаны использованные методы биохимических исследований. Состав и содержание фенольных соединений, каротиноидов и пектиновых веществ исследовали современными методами высокоэффективной хроматографии и спектрофотометрии. Показаны особенности этих методов при определении разных групп соединений (флавонолов, катехинов, танинов, пектиновых веществ, каротиноидов). Анализ химических элементов проводили методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Кроме того, в работе описаны методики измерения антиоксидантной активности.

Для математической обработки использованы общепринятые методы. Кроме того, автор использовала метод парных коэффициентов сходства с точки зрения хроматографического сходства.

Глава 3 посвящена изучению биологически активных веществ (БАВ) и элементного состава представителей рода *Bistorta*. В разделе 3.1 приведены данные о химическом составе изучаемых видов на основе литературных источников. В разделе 3.2 М.С. Воронковой отмечено высокое содержание основных групп БАВ в образцах всех исследованных видов, например, флавонолов (до 11 %), катехинов (14 %), танинов (до 33 %), сапонинов (до 24 %). Кроме того, отмечены органы растений с наиболее высоким содержанием БАВ. В разделе 3.3 автор приводит результаты исследований фенольных соединений (флавонолов, флавонов и фенолкарбоновых кислот) методом ВЭЖХ. В составе нативных экстрактов листьев и соцветий обнаружены 26 фенольных соединений, некоторые из которых идентифицированы. Установлено, что состав и содержание фенольных соединений специфичен для каждого вида и органа, что подтверждается приведенными в работе хроматограммами. В разделе 3.4 показано сходство по содержанию макро- и микроэлементов *B. attenuata* и официального вида *B. officinalis*.

В **главе 4** приводятся результаты изучения изменчивости растений рода *Bistorta* по составу и содержанию фенольных соединений. Установлено (раздел 4.2), что в одних и тех же условиях в надземных органах *B. officinalis* и *B. attenuata* наблюдается значительная изменчивость в накоплении флавоноидов и катехинов по годам, а у танинов – изменчивость незначительная. В течение эксперимента (2011-2014 гг.) наибольшее количество флавоноидов и катехинов отмечено в бутонах *B. officinalis* по сравнению с листьями. Однако, в листьях *B. officinalis* пик накопления флавонолов приходится на фазу цветения, а у *B. attenuata* – бутонизации.

Показано, что содержание танинов и катехинов в корневищах *B. officinalis* намного выше, чем у *B. attenuata* и *B. vivipara*. Соцветия *B. attenuata* накапливают большее количество флавонолов и танинов по сравнению с другими видами. В целом, отмечен высокий уровень индивидуальной изменчивости содержания фенольных соединений.

Методом ВЭЖХ исследованы экстракты листьев растений трех видов – *B. officinalis*, *B. alopecuroides*, *B. elliptica*, произрастающих в разных природных популяциях на территории Азиатской России. Сравнение всех популяций изученных видов подтверждает наличие межвидовых различий. Факторный анализ сходства методом главных компонент показал, что по первому фактору растения *B. elliptica* располагаются между двумя видами *B. alopecuroides* и *B. officinalis* с самостоятельными интервалами варьирования состава фенольных соединений. По второму фактору растения *B. elliptica* занимают обособленное положение относительно двух других видов, что свидетельствует о самостоятельности этого таксона. Выявлены диагностические химические признаки для *B. officinalis*, *B. alopecuroides*, *B. elliptica*. *B. officinalis*, имеющий самый обширный ареал, отличается полиморфизмом состава фенольных соединений и расположен обособленно от двух других видов. Наблюдается изменчивость растений по географическому признаку. Результаты по индивидуальной и географической изменчивости подтверждены большим фактическим материалом, помещенным в приложениях 3 и 4.

Глава 5. В ней рассматривается применение данных о составе фенольных соединений в систематике азиатских видов рода *Bistorta*. На основании литературных

данных автор останавливается на хемотаксономии, как методе изучения систематики высших растений. В работе приведены результаты сравнительного изучения состава фенольных соединений методом ВЭЖХ в листьях растений азиатских видов: *B. officinalis*, *B. manshuriensis*, *B. pacifica*, *B. plumosa*, *B. elliptica*, *B. attenuata*, *B. alopecuroides*, *B. vivipara*. Материалы этой главы являются итогом всей проделанной работы. Кластерный анализ, проведенный автором по составу фенолгликозидов в листьях изученных видов показал, что эти виды разделяются на 2 блока, что иллюстрируется на дендрограмме. Первый блок состоит из двух групп – в одной *B. officinalis*, в другой – 4 вида – *B. manshuriensis*, *B. pacifica*, *B. plumosa*, *B. vivipara*. Дауро-маньчжурский *B. manshuriensis* и восточно-азиатский *B. pacifica* близки друг к другу по составу фенолгликозидов, но отличаются от евразийских и сибирских видов. Ареалы у них типично восточно-азиатские. У *B. manshuriensis* отмечен наибольший состав гликозидов и он имеет общие соединения с сибирскими видами. *B. vivipara* близок по составу фенолгликозидов с *B. plumosa*, несмотря на то, что эти виды относятся к разным секциям. В первой группе ключевым видом, по мнению автора, является вид *B. officinalis*, широко распространенный в Евразии. Возможно, этот вид дал начало остальным видам в различных участках его ареала.

Во второй блок входят *B. elliptica*, *B. alopecuroides*, *B. attenuata*, причем *B. elliptica* по составу фенольных соединений ближе к *B. alopecuroides*. Выше (глава 4) была показана видовая самостоятельность *B. officinalis*, *B. alopecuroides*, *B. elliptica*. Это согласуется со взглядами Н.Н. Цвелева (1989), который указывает на большой полиморфизм *B. elliptica* и на возможное его происхождение в результате гибридизации *B. officinalis* и *B. alopecuroides*. У *B. attenuata* отмечен особый характер накопления фенольных соединений, что позволяет рассматривать его как самостоятельный вид и не подтверждает его в качестве переходной формы между *B. officinalis* и *B. alopecuroides*. Таким образом, полученные автором данные подтверждают существующую систему азиатских видов рода *Bistorta*, представленную во «Флоре Сибири» (1992) и в сводке «Сосудистые растения советского Дальнего Востока» (1989).

Автор показал, что близкородственные виды *B. elliptica* и *B. plumosa* имеют незначительные морфологические различия. Однако они отличаются по компонентному составу фенольных соединений экстрактов листьев и соцветий, что свидетельствует о видовой самостоятельности. Этот признак можно использовать при идентификации сборов.

Глава 6 рассматривает практическое применение рода *Bistorta*. Приведены литературные данные о биологической активности видов этого рода. Основное внимание уделено официальному виду *B. officinalis*. Впервые приведена оценка антиоксидантной активности водно-спиртовых экстрактов из надземных органов этого вида. В экстрактах листьев и репродуктивных органов антиоксидантная активность возрастает к фазе цветения. Автор установила, что виды рода *Bistorta* являются источниками целого ряда ценных в лекарственном отношении веществ, а также выявила фенофазы с максимальным накоплением этих веществ.

Установлено, что экстракт из корневищ *B. officinalis* эффективен при лечении гингивита и превосходит по терапевтическому эффекту широко распространенное средство «Метрогил Дента» (Индия).

Оценка антимикотического действия экстракта корневищ *B. officinalis* относительно возбудителя кандидоза *Candida albicans* показала, что корневища могут быть рекомендованы для разработки узконаправленного или профилактического препарата при лечении кандидоза.

Выводы, сделанные М.С. Воронковой, вытекают из содержания диссертации.

В целом, работа М.С. Воронковой выполнена на высоком научном уровне с применением как классических, так и современных биохимических и математических методик. Отдельно хочется отметить лаконичный стиль работы, отсутствие

грамматических ошибок в тексте. Структура диссертационной работы хорошо продумана, большой фактический материал удачно размещен и обеспечивает наглядность полученных результатов.

Тем не менее, хотелось бы сформулировать ряд вопросов и замечаний:

1. По какой классификации ареалов виды рода *Bistorta* из Азиатской России названы азиатскими (с. 45 и ниже)? Это не совсем корректно, так как они имеют разные типы ареалов.
2. Коэффициент вариации используется при изучении индивидуальной изменчивости содержания флавонолов, танинов и катехинов в органах трех видов (с. 81). При изучении географической изменчивости использован факторный анализ сходства биохимических признаков. Однако здесь так же было бы весьма полезно рассчитать коэффициент вариации, поскольку при возможных в будущем заготовках необходимо знать изменчивость содержания основных БАВ в пределах ареалов изученных видов.
3. На дендрограмме (с. 103, рис. 22), построенной по составу фенолгликозидов и хроматограмм, *B. officinalis* и *B. elliptica* обособлены. Однако в природе часто встречаются промежуточные морфологические формы этих видов (Некратова, 1995), о чем автор сама пишет во введении, обозначая актуальность исследования (с. 4). Именно такие «спорные» образцы больше всего нуждаются во вспомогательных методах при идентификации. Из работы неясно, включались ли в исследование промежуточные морфологические формы, и могут ли его результаты быть полезны в таких случаях. Также в работе не сформулировано, каким образом условия произрастания вида (увлажнение почвы, инсоляция и т.д.) отражаются на компонентном составе и количественном содержании фенольных соединений. Это могло бы быть полезно для практического использования результатов исследования при сборе сырья.
4. Странно то, что автор оставил без внимания результаты зарубежных молекулярно-генетических исследований изучаемых таксонов (Lamb Frye, Kron, 2003; Galasso et al., 2009; и др.) и не сопоставил с ними получившуюся дендрограмму сходства (с. 103, рис. 22). Это существенное упущение. Тем более, современный этап развития систематики и таксономии характеризуется комплексным подходом с опорой на секвенирование фрагментов геномной ДНК. Результаты хемотаксономического анализа нуждаются в соотнесении с данными, полученными другими методами (сравнительно-морфологическим, палинологическим, эмбриологическим, молекулярно-генетическими, и др.).

Диссертационная работа М.С. Воронковой представляет собой законченное научное исследование. Тема диссертационного исследования актуальна. Новизна, теоретическая и практическая значимость очевидны. Работа изложена грамотным научным языком, доступна для восприятия, материал хорошо иллюстрирован таблицами и рисунками.

Выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы, соответствуют поставленным задачам, защищаемые положения доказаны.

Результаты исследований опубликованы в 20 печатных работах в отечественных изданиях, из них 7 статей из перечня ВАК РФ. Основные результаты исследований были представлены и обсуждены на Всероссийских и Международных конференциях.

Содержание автореферата соответствует диссертации.

Результаты исследований опубликованы в 20 печатных работах в отечественных изданиях, из них 7 статей из перечня ВАК РФ. Основные результаты исследований были представлены и обсуждены на Всероссийских и Международных конференциях.

Содержание автореферата соответствует диссертации.

Заключение. Диссертационная работа М.С. Воронковой на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Вторичные метаболиты азиатских видов рода *Bistorta* (L.) Scop. (Polygonaceae) в связи с хемотаксономией и практическим использованием», выполненная на актуальную тему, является научной квалификационной работой и представляет собой законченный научный труд, соответствующий требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением правительства РФ № 842 от 24.09.2013, а соискатель заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – ботаника.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник,
инженер-исследователь лаборатории систематики и филогении растений
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

27.12. 2016

Некратова Наталья Алексеевна, инженер-исследователь лаборатории систематики и филогении растений ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», доктор биологических наук, старший научный сотрудник.

Специальность по диплому: 03.02.01 – Ботаника

Адрес: 634012, г. Томск, ул. Киевская, д.86, кв. 24

Тел: 8-909-547-35-02

e-mail: nnekrat@gmail.com