

Отзыв

Официального оппонента на диссертацию Викторнии Александровны Кузнецовой «Формирование адаптивных реакций дикой и культурной сои к окислительному стрессу под воздействием неблагоприятных факторов в условиях Амурской области», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 - Экология

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Благовещенский государственный педагогический университет»

Традиционным лидером Российской Федерации по производству сои является Амурская область. В 2015 году валовое производство в регионе составило более 1 млн. тонн маслосемян. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации поставило задачу: к 2024 году амурские аграрии должны увеличить объем производства сои больше чем в два раза – до 2 200 000 тонн.

Получение высоких и стабильных урожаев сои ограничивается действием разных экологических факторов. В Амурской области к неблагоприятным экологическим факторам, влияющим на продуктивность сои, относятся высокие летние и низкие температуры, вызывающие тепловой и холодовой стрессы у растений. К сожалению, с/х почвы могут содержать значительное содержание тяжелых металлов, что усугубляет окислительный стресс у растений. Повышение адаптивных способностей сои к неблагоприятным факторам среды может способствовать повышению ее продуктивности.

Практически не изучены роль пероксидаз и изофлавонов в формировании адаптивных реакций сои и способы снижения у нее окислительного стресса, вызванного высокими перепадами температур и воздействием тяжелых металлов. Цель работы – определить роль пероксидаз и изофлавонов в формировании адаптивных реакций сои и разработать способы снижения у нее окислительного стресса, вызванного высокими перепадами температур и воздействием тяжелых металлов. Диссертационная работа Викторнии Александровны Кузнецовой **актуальна**, поскольку представляет собой комплексное исследование, основанное на выявлении увеличения количества видоспецифичных соевых эндогенных изофлавонов способствующих повышению устойчивости растений и их семян к неблагоприятному воздействию температур и солей тяжелых металлов, что расширяет представления об адаптивных возможностях сои.

Работа логична, компактна, хорошо продумана. Все выдвинутые автором задачи полностью решены в ходе исследования.

Научная новизна по мнению автора выражается в выявлении множественных форм пероксидаз, участвующих в формировании устойчивости сои к окислительному стрессу, вызванному неблагоприятными условиями среды Амурской области. Впервые отмечено, что увеличение количества видоспецифичных соевых эндогенных изофлавонов способствует повышению устойчивости растений и их семян к неблагоприятному воздействию температур и солей тяжелых металлов. Исследования автора показали, что наличие или отсутствие определенных множественных форм пероксидаз является откликом растений на неблагоприятное температурное воздействие и наличие в местах произрастания сои солей тяжелых металлов. Результаты работы расширяют представления об адаптивных возможностях сои.

Теоретическая и практическая значимость работы определяются тем, что результаты работы послужили основой для разработки автором ТУ, ТИ и регистрации препарата «ЭкоЛарикс» (свидетельство о государственной регистрации 253-07-721-1 от 29.07.15 г.) в Министерстве сельского хозяйства РФ. Эффективность действия препарата подтверждена 12 актами внедрения, полученными от агропредприятий Амурской области, которые подтверждают, что регулятор роста растений увеличивает урожайность сои.

Результаты исследований могут являться основой для разработки других стимуляторов роста растений, а также могут использоваться для проведения мониторинга металлического загрязнения почв в местах выращивания сои.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложения, включает 34 рисунка и 12 таблиц. Список литературы включает 240 источников, из них 116 иностранных.

Глава 1. Обзор литературы. Глава посвящена обзору состояния изученности антиоксидантной системы растений при воздействии окислительного стресса.

Автор подробно приводит данные о влиянии окислительного стресса на растения. Отмечает, что, не смотря на существование множества теорий развития стрессовой реакции у растений, общая концепция стресса, которая бы позволила описать реакцию любого растительного организма на возмущающий фактор, пока еще не разработана.

Согласно теории неспецифической реакции растений на стрессовое воздействие, любой неблагоприятный фактор может вызвать универсальную реакцию организма. Автор отмечает, что окислительный стресс был недавно признан одним из самых главных отрицательных факторов действия жары на растения. Жара вызывает дисбаланс между количеством поглощенной пигментами солнечной радиации и транспортом электронов через цитохромы – процесс, названный фотоингибированием. Избыточная энергия может перейти на кислород, что приводит к образованию АФК. Рассмотрению влияния тяжелых металлов на растения и адаптации к ним В.А. Кузнецова посвящает значительный материал. На мой взгляд, автору следовало рассмотреть влияние отдельных форм металлов на растения. Так-как именно нахождение в почве растворимых соединений отдельных металлов оказывает негативное влияние на существование растений. Особый интерес в этом плане вызывают исследования реакции компонентов антиоксидантной системы на молекулярном уровне, позволяющие выяснить эколого-биологические механизмы адаптации сои к стрессорам разной природы и получить новые экспериментальные данные, развивающие представления о стрессе в растениях.

Следует отметить, что весьма тщательно проработаны отечественные (125) и зарубежные источники (115). Показана целесообразность и необходимость исследования характера взаимодействия разных компонентов защитной системы в контроле структурной организации и функционирования АОС в условиях стресса.

В главе 2 «Материалы и методы», В.А. Кузнецова приводит материалы исследования, которыми служили культурная (*Glycine max* (L.) Merrill) соя сорта Соната и дикая (*Glycine soja* Siebold et Zucc.) соя, форма КА-1344. Подробно описаны методы экстракции белков для определения пероксидазной активности.

Активность пероксидаз сои определяли фотометрическим методом по Бояркину в модификации Мокроносова на фотоэлектрическом концентрационном колориметре марки КФК-2.

Для изучения множественных форм пероксидаз был использован метод электрофореза в полиакриламидном геле (Devis, 1964).

В пункте 2.2.6. диссертации представлен анализ содержания изофлавонов сои методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации со спектроскопией в УФ-области спектра на хроматографе «Милихром А-02».

В пункте 2.2.7 дано определение металлов в почвах и растениях атомно-абсорбционным методом. Возникает ряд вопросов к методам определения металлов:

1. При подготовке проб растений к анализу металлов, какими ГОСТами пользовался автор?

2. Есть методики определения металлов в биологических объектах и почвах. В почвах существуют методики для различных форм растворимых и валовых. Определяли ли содержание металлов в эксперименте после внесения добавок?

3. Какая чувствительность определения кадмия у атомно-абсорбционного метода в пламени, достаточная ли для определения этого элемента в растениях?

4. Отсутствуют методики приготовления растворов сульфатов металлов. Нет обоснования применения в эксперименте сульфатов свинца и кадмия.

Глава 3. «Характеристика температурного влияния и физико-химических параметров пероксидаз семян дикой и культурной сои» представляет собой одну из основных частей диссертации по научной значимости.

В разделе 3.1. в ходе ряда экспериментов показано, что удельная активность пероксидаз семян сои значительно различается в зависимости от вида ткани семени. Анализ множественных форм пероксидаз показал, что количество форм фермента также различается в зависимости от вида ткани семени.

В зародыше автор выявила всего две формы фермента П17 (высокомолекулярная форма) и П6 (форма со средней электрофоретической подвижностью), в семядолях – четыре формы П5, П8, П15 и П17, которые обнаружены также в целых семенах наряду с низкомолекулярными формами П2 и П1. В семенной оболочке выявлено 9 множественных форм пероксидаз с разной электрофоретической подвижностью, 6 из которых обнаружены в целых семенах, а 3 формы найдены только в семенной оболочке – П13, П10 и П3. Можно согласиться с автором, что это связано с большей интенсивностью окислительно-восстановительных процессов в семенной оболочке.

Таким образом, в семенах сои при тканевом анализе всего соискатель выявила 9 форм пероксидаз, отличающихся электрофоретической подвижностью (Rf) и тканевой специфичностью. Форма П17 установлена во всех исследуемых образцах.

В этом же разделе показана зависимость активности фермента от pH. Для семян культурной сои пик активности пероксидаз выявлен при pH 4,7, а для дикой сои – при pH 5,5.

Раздел 3.2. посвящён характеристике устойчивости семян культурной и дикой сои к воздействию температур с участием пероксидаз. Автор показала, что при температурах +4 и +45°C в семенах дикой и культурной сои повышается содержание МДА в отличие от содержания при «нормальной» температуре +23 °С.

Замечания к этой части работы сводятся к некорректному представлению результатов в табл. 2. (стр. 52). В ней показана концентрация МДА, а не уровень.

Следует отметить, значимость исследования, которое показало, что в условиях холодогового и теплогового стрессов в семенах сои присутствует только одна форма пероксидаз со средней Rf (П6). Проращивание семян сои при +37 и +42°C приводит к возникновению новых форм пероксидаз и становление механизмов формирования устойчивости семян к окислительному стрессу, вызванному высокими и низкими положительными температурами в течение 5 ч с участием пероксидаз.

В разделе 3.3. дана оценка устойчивости проростков сои к температурному стрессу в течение 5 суток с участием пероксидаз, изофлавонов и дигидрокверцетина.

Следует отметить значимые результаты представленные в этом разделе. На мой взгляд к ним относятся - проращивание сои в течение 5 суток при влиянии температур +4°C и +45°C в течение 5 ч и дальнейшем проращивании при +23°C в течение 5 суток приводит к проявлению окислительного стресса в проростках, при этом уменьшается уровень МДА, изменяется активность пероксидаз, содержание изофлавонов и биометрические показатели в зависимости от условий проращивания.

Внесение дигидрокверцетина (ДГК) оказывает защитную функцию проростков сои от температурного стресса, вызванного температурами +4°C и +45°C, значительно снижая при этом уровень МДА.

Увеличение количества множественных форм (МФ) пероксидазы биологически оправдано, так как расширяет физиолого-биохимические возможности сои в ее приспособлении к неблагоприятным условиям, обеспечивает слаженность и гибкость работы механизмов адаптации антиоксидантной системы сои.

Замечания к этой части работы сводятся к некорректному представлению результатов в табл. 3. (стр. 56).

В главе 4. Дана оценка устойчивости сои к воздействию солей тяжелых металлов с участием пероксидаз, изофлавонов и дигидрохверцетина.

В разделе 4.1. показано, что в присутствии исследуемых концентраций ДГК активность пероксидаз семян сои возрастает незначительно. Однако, в таблице 4, которая называется «Влияние разных концентраций ДГК 90%-й чистоты на активность пероксидаз семян сои», показано не влияние, а представлены концентрации ДГК и Ауд. ед/мг белка. Влияние, обычно представляется на графиках.

В разделе 4.2 следует отметить выявление Кузнецовой В.А. в образцах культурной сои после внесения ТМ, 8 новых форм пероксидаз по сравнению с контролем, а в дикой – П, что свидетельствует о повышенном адаптивном потенциале дикой сои.

Из раздела 4.3. следует, что совместное антиоксидантное действие пероксидаз сои и ДГК играет огромную роль в формировании защитного механизма семян сои в условиях окислительного стресса, что обуславливает устойчивость семян сои к воздействию ТМ.

Однако, таблица 5 вызывает недоумение. Во-первых, в ней представлено не количество, а концентрации веществ; во-вторых, огромные (0,4 мг/г) концентрации Cd в семенах сои свидетельствуют о неверном выборе действующих концентраций, не существующих в природе.

Вывод автора о том, что совместное антиоксидантное действие пероксидаз сои и ДГК играет огромную роль в формировании защитного механизма семян сои в условиях окислительного стресса, что обуславливает устойчивость семян сои к воздействию ТМ имеет экспериментальное подтверждение.

В последующих двух разделах автор убедительно показывает формирование устойчивости проростков сои к окислительному стрессу, вызванному воздействием сульфата кадмия, с участием пероксидаз, изофлавонов и ДГК и приводит оценку влияния ДГК, арабиногалактана и их комплексов на активность пероксидаз и содержание изофлавонов в семенах сои.

Практическое значение имеет эксперимент обработки семян комплексом АГ+ДГК (1:3). Препараты вызывают усиление обменных процессов, что приводит к повышению содержания изофлавонов и увеличению пероксидазной активности, а также к увеличению высоты растений.

В главе 5 приведена встречаемость и характеристика множественных форм пероксидаз сои, полученных при различных условиях среды. Важно, что автор показала, что низкомолекулярные формы пероксидаз проявляются в процессе действия стресса и в период последействия стресса, высокомолекулярные формы обладают крайне редкой встречаемостью.

В результате всего комплекса проведенных экспериментов, Кузнецова В.А. обобщила и охарактеризовала формы пероксидаз, функционирующие в нормальных условиях и при воздействии окислительного стресса.

Общие замечания к диссертации связаны с недостаточной обоснованностью выбора форм тяжелых металлов для постановки эксперимента. В автореферате и диссертации имеются неудачные выражения, небольшое число неисправленных опечаток и ошибок.

Все высказанные замечания призваны не уменьшить достоинства этой работы, но помочь автору увидеть большее экологическое значение своих результатов.

Результаты исследований Викторией Александровной Кузнецовой прошли достаточную апробацию и представлены в 33 публикациях, в том числе в 5 в изданиях, рекомендованных ВАК, в 2 статьях в зарубежных журналах, 22 статьи в материалах международных, всероссийских и межрегиональных конференциях.

Автореферат соответствует структуре, основным идеям и выводам рассматриваемой диссертации, в сжатой форме представляет основные результаты исследования. Все

выводы, приведённые в автореферате, имеют экспериментальное подтверждение и обоснование.

Диссертационная работа Виктории Александровны Кузнецовой полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в ред. от 02.08.2016г.), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата, а Виктория Александровна Кузнецова заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология.

Доктор биологических наук (03.02.08 – экология),
вед. н. с. Тихоокеанского филиала
Всероссийского научно-исследовательского
института рыбного хозяйства и
океанографии. «ТИНРО»



Ковековдова Лидия Тихоновна

690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4,
Тел.: 8 (423) 240 09 21; E-mail: tinro@tinro-center.ru
E-mail: kovekovdova@mail.ru; Тел. +7 9510088354



Личную подпись Л.Т. Ковековдовой заверяю
Ученый секретарь ТИНРО-Центра, к.т.н.



Наталья Юрьевна Макарова

24.08. 2020 г.