

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Корсуковой Анны Викторовны
«ИЗМЕНЕНИЕ ХОЛОДО- И МОРОЗОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОРОСТКОВ
ЗЛАКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЕБУКОНАЗОЛ-СОДЕРЖАЩЕГО
ПРОТРАВИТЕЛЯ СЕМЯН», представленную к защите на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.05 – физиология и биохимия растений

К числу наиболее часто встречающихся в природе стрессовых факторов, вызывающих нарушение водного режима, ограничивающих рост и продуктивность растений, относится низкотемпературный стресс. Поэтому проблема повышения устойчивости растений к действию низких температур является весьма актуальной и представляет не только фундаментальный, но и практический интерес в связи с большими потерями, которые несет сельское хозяйство в результате периодических понижений температуры, в том числе и заморозков. В этом отношении довольно перспективным является поиск препаратов – адаптогенов, повышающих устойчивость растений к низкотемпературному стрессу, обладающих низкой фитотоксичностью и экологической безопасностью.

В настоящее время в сельском хозяйстве широко используются фунгицидные препараты – производные триазола, а именно 1,2,4-триазола. Эти соединения кроме фунгицидных обладают еще и ретрандантными свойствами. Они увеличивают содержание эндогенной абсцизовой кислоты, оказывая ингибирующее влияние на прорастание семян и рост осевых органов растений. Имеются также данные о способности некоторых соединений триазола повышать морозоустойчивость растений. Однако, механизмы повышения морозоустойчивости растений и их благополучного выхода из закаленного состояния производными 1,2,4-триазола недостаточно изучены.

Поэтому поставленная Корсуковой Анной Викторовной задача по изучению взаимосвязей между физиологическими, биохимическими параметрами и морозостойкостью проростков злаков, выращенных из семян, обработанных препаратами – адаптогенами, в частности производным 1,2,4-триазола – тебуконазол-содержащим протравителем, представляется важным как в научном, так и в практическом плане.

Прежде чем перейти к рассмотрению работы, позвольте остановиться на формальных положениях. Диссертация написана традиционно и включает следующие

главы: введение, обзор литературы по изучаемой проблеме, материалы и методы, результаты исследования и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Объем диссертации составляет 181 страницу машинописного текста, в том числе 26 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 346 источников, из которых 157 отечественных авторов.

Во введении раскрывается актуальность поставленной проблемы, цели и задачи исследования, научная новизна работы, ее научно-теоретическое значение. Приводятся сведения о практической реализации полученных результатов, а также о связи работы с плановыми исследованиями и научными программами.

Глава 1 – обзор литературы, изложена на 51 странице. Обстоятельный обзор литературы посвящен изложению представлений о физиолого-биохимических изменениях, приводящих к формированию устойчивости травянистых растений к низкотемпературному стрессу, рассмотрены последние данные о процессах, протекающих при выходе озимых культур из состояния покоя и переходе к вегетации в весенний период, т.е. при раззакаливании. Уделено внимание свойствам ретардантов, главным образом, производным 1,2,4-триазола, которые способствуют повышению холодо- и морозоустойчивости растений. В целом обзор литературы обширен, многогранен и свидетельствует о большом литературном багаже автора.

Довольно удачным является наличие раздела «Выводы из обзора литературы, формулировка цели исследования». Здесь удалось проанализировать массив полученных к настоящему времени научных данных и сформулировать те актуальные вопросы, которые остались все еще нерешенными и составили цель проведенного автором исследования.

Глава 2 посвящена материалам и методам исследования. При проведении исследований автором использовался широкий спектр физиологических, биохимических и иммунологических методов: исследование ростовых процессов и определение жизнеспособности клеток колеоптилей, выделение митохондрий из проростков злаков, определение скорости потребления кислорода митохондриями или кусочками растительных тканей полярографическим методом, спектрофотометрические методы определения содержания водорастворимых углеводов, хроматографический анализ жирнокислотного состава мембран, денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн-блоттинг. Все это свидетельствует о хорошей экспериментальной подготовке диссертанта, ее интересе к поставленной проблеме.

Результаты собственных экспериментов автора диссертации изложены в 3 главе на

52 страницах машинописного текста и содержат 18 рисунков.

В настоящее время показано, что одним из свойств производных триазола, в частности тебуконазола, является ретардантный эффект, а торможение роста является необходимым условием для формирования закалённого состояния растений. В связи с этим автор исследует концентрационную зависимость ингибирующих рост свойств тебуканозол-содержащего препарата «Бункер». На этиолированных проростках злаков, выращенных из семян, обработанных этим протравителем, Анна Викторовна показывает, что данный препарат в дозах от 0,5 до 5 мкл/г семян ингибировал рост проростков и этот эффект имел концентрационную зависимость. При этом препарат в концентрации 1,5 мкл/г семян оказывал ингибиторный эффект по величине сопоставимый с действием 1 мМ раствора тебуканозола. Поэтому в своей дальнейшей работе автор использует именно эти концентрации протравителя и тебуканозола.

Исследуя изменение жизнеспособности клеток колеоптилей этиолированных проростков озимой пшеницы и изменение функционального состояния выделенных из них митохондрий в естественных условиях старения и при обработке тебуканозол-содержащим препаратом, автор продемонстрировала, что обработка семян злаков этим препаратом способствовала повышению жизнеспособности клеток колеоптилей злаков, у которых в естественных условиях старения происходит снижение интактности митохондрий, выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму с последующим запуском механизма ПКГ.

Корсуковой Анной Викторовной было проведено комплексное исследование влияния низкотемпературного закаливания и обработки семян тебуконазол-содержащим препаратом «Бункер» на устойчивость к низкотемпературному стрессу проростков различающихся по морозостойкости и зимостойкости зерновых культур (яровая и озимая пшеница, озимая рожь). При этом диссертант изучала содержание в тканях криопротекторных соединений таких как растворимые углеводы, стрессовые белки и ненасыщенные жирные кислоты, предупреждающие обезвоживание клетки в результате образования льда в межклетниках. Автор отмечает, что обработка семян исследуемым препаратом приводила к повышению степени ненасыщенности жирных кислот (ЖК) у незакалённых к холоду проростков всех исследуемых злаков в основном за счет снижения содержания пальмитиновой кислоты и увеличения содержания α -линоленовой кислоты. Низкотемпературное закаливание проростков озимой пшеницы из обработанных семян вызывало увеличение содержания α -линоленовой кислоты (маркера криорезистентности растительных клеток), повышение индекса двойных связей и отношения суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных ЖК. Интересен и

тот факт, что по содержанию α -линоленовой кислоты прошедшие низкотемпературное закаливание проростки озимой пшеницы из обработанных семян приближались к уровню проростков из необработанных семян озимой ржи, прошедших низкотемпературное закаливание.

Далее, учитывая роль дегидринов в условиях низкотемпературной адаптации и при раззакаливании, автор уделил внимание изучению содержания дегидринов в тканях побегов этиолированных проростков из семян, обработанных и необработанных исследуемым препаратом. Ею установлено, что обработка тебуконазол-содержащим протравителем семян индуцировала в побегах яровой и озимой пшеницы синтез новых низкомолекулярных дегидринов, особенно с молекулярной массой 27 кДа, которые продолжали присутствовать в спектре дегидринов данных злаков и после раззакаливания. Показано, что обработка семян озимой ржи тебуконазол-содержащим препаратом после низкотемпературного закаливания не приводила к синтезу новых дегидринов. Однако, в тканях этих проростков после раззакаливания детектировали дегидрины с молекулярной массой 16 и 23 кДа.

Протекторные свойства использованного в работе препарата, по мнению автора, обусловлены также ростом содержания растворимых углеводов в тканях проростков поскольку, обладая криопротекторными и антиоксидантными свойствами, они являются еще и основными субстратами дыхания. Проведенный автором анализ изменений в содержании водорастворимых углеводов у злаков с разной степенью морозоустойчивости свидетельствовал о различном механизме действия тебуконазол-содержащего препарата на изучаемые злаки. Интересен тот факт, что тебуконазол-содержащий протравитель не оказывал значительного влияния на метаболизм углеводов проростков озимой ржи при раззакаливании растений и следующим за ним промораживании. В то же время препарат приводил к накоплению водорастворимых углеводов и сохранению высокого уровня их содержания в результате закаливания, раззакаливания и промораживания раззакаленных проростков озимой пшеницы. На основании исследования интенсивности дыхания тканей проростков злаков при низкотемпературном закаливании, раззакаливании и обработки препаратом «Бункер» автор делает заключение, что повышенное содержание сахаров в тканях побегов проростков, выращенных из обработанных препаратом «Бункер» семян, связано с более экономным расходом сахаров.

Далее Анна Викторовна уделила внимание биоэнергетическим характеристикам митохондрий, выделенных из проростков различных групп. Она изучила окисление NAD-зависимых субстратов, сукцината и аскорбата+ТМФД митохондриями

проростков озимой пшеницы при обработке протравителем «Бункер» и тебуконазолом в контрольных условиях и в условиях низкотемпературного закаливания. Ею показано, что тебуконазол ингибировал транспорт электронов в комплексе I дыхательной цепи, при этом он не влиял на транспорт электронов по альтернативному пути. В то же время препарат «Бункер» ингибировал транспорт электронов как по цитохромному пути, так и по альтернативному пути. Различное влияние изучаемых препаратов на биоэнергетические характеристики митохондрий автор объясняет влиянием на эти характеристики веществ, входящих в состав протравителя помимо тебуконазола. Автор отмечает, что способность тебуконазола подавлять цитохромный путь дыхания на уровне комплекса I дыхательной цепи митохондрий, возможно, позволяет экономить субстраты окисления – водорастворимые углеводы. При этом обнаружено, что обработка этиолированных проростков озимой пшеницы тебуконазолом с последующим низкотемпературным закаливанием проростков приводила к статистически значимому росту вклада альтернативного пути в дыхание при окислении митохондриями малата и сукцината. Как она предполагает, это обеспечивало снижение генерации АФК митохондриями при действии низких температур, а, следовательно, и повышение устойчивости проростков к низкотемпературному стрессу.

И, наконец, изучая влияние препарата «Бункер» на холодо- и морозоустойчивость злаков при закаливании и после раззакаливания диссертант отмечает 25% увеличение выживаемости обработанных препаратом проростков яровой пшеницы при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. При этом обработка протравителем семян в 2,5 раза повышала выживаемость проростков озимой пшеницы. Важен тот факт, что выживаемость обработанных препаратом проростков яровой и озимой пшеницы после раззакаливания и последующего действия отрицательных температур превышала таковую у необработанных проростков на 23 и 41%, соответственно.

Экспериментальная часть работы завершается небольшим заключением, где отражены основные положения проведенного исследования, их интерпретация и обсуждение. Хотелось бы отметить, что хорошо и логично написан раздел «Заключение». Анализируя литературные данные и сопоставляя их с полученными экспериментальными данными, автор создает довольно удачную «Гипотетическую схему участия триазолов в повышении морозоустойчивости злаков» (рис. 26), которая наглядно иллюстрирует предполагаемые изменения метаболизма злаков при обработке тебуконазолом. По мнению диссертанта протекторная активность исследуемых препаратов обусловлена влиянием действующего вещества препарата на ряд структурных и физиолого-биохимических параметров в клетках и тканях растений

(ингибирование роста, увеличение степени ненасыщенности жирных кислот, синтез низкомолекулярных дегидринов, увеличение содержания водорастворимых углеводов). Суммируя полученные результаты, Корсукова Анна Викторовна отмечает, что повышенное содержание сахаров, дегидринов и ненасыщенных жирных кислот, более поздняя активация дыхания позволяют повышать выживаемость холодозакаленных проростков злаков при промораживании и раззакаливании с последующим промораживанием, т.е. повышает холодо- и морозоустойчивость проростков, что особенно актуально для озимой пшеницы в условиях неустойчивого ранневесеннего периода с оттепелями и последующими заморозками.

К работе имеются небольшие замечания:

В разделе 3.4.2. Окислительная и фосфорилирующая активность митохондрий при использовании препарата «Бункер» в таблицах 6 и 7 автор приводит значения скоростей окисления субстратов митохондриями проростков озимой пшеницы забыв указать их размерность ($\text{нг-моль} / \text{мг белка} \times \text{мин}$ или $\text{нг-атом} / \text{мг белка} \times \text{мин}$). Тем не менее эта размерность, а именно: ($\text{нг-моль} / \text{мг белка} \times \text{мин}$) представлена в автореферате.

В этом же разделе автор сопоставляет скорости окисления субстратов митохондриями проростков озимой пшеницы в контрольных условиях и при низкотемпературном закаливании (стр. 128). При этом читателю предлагается сравнить данные таблиц 6 и 7, которые находятся далеко друг от друга (на расстоянии 7 страниц), что затрудняет их восприятие. Однако, этот недостаток преодолен в автореферате, где на одном рисунке (рисунок 7) приведены эти данные.

Данные недостатки не носят принципиальный характер и не снижают ценность рецензируемой работы. Проведенное исследование позволило Анне Викторовне Корсуковой убедительно показать возможность и необходимость использования тебуконазол-содержащих препаратов для повышения холодо- и морозоустойчивости проростков злаков. Полученные автором новые данные и выявленные закономерности могут быть полезны в сельскохозяйственной практике. Диссертационная работа Анны Викторовны Корсуковой является законченным научным исследованием, выполненным на современном научно-методическом уровне. Полученные результаты соответствуют поставленным целям и задачам, а также заявленной научной специальности и имеют не только теоретическое, но и практическое значение. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате и опубликовано в

периодических изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, в других рецензируемых журналах и материалах Всероссийских конференций.

Все выше изложенное позволяет считать, что диссертационная работа Корсуковой Анны Викторовны «Изменение холодо- и морозоустойчивости проростков злаков под действием тебуконазол-содержащего протравителя семян» отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённому постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор – Анна Викторовна Корсукова – заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Д.б.н., специальность: 03.01.02 –
биофизика (биологические науки),
ведущий научный сотрудник
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биохимической физики им.
Н.М. Эмануэля Российской академии
наук (ИБХФ РАН)

Жигачева Ирина Валентиновна

Подпись Жигачевой Ирины Валентиновны заверяю:
ученый секретарь ИБХФ РАН, к.х.н.



Долгая М.М.

Почтовый адрес: 119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4,
Тел.: +7(495)939-74-09, факс: +7(499)137-41-01
E-mail: zhigacheva@mail.ru