

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научно-исследовательской работе и международным связям
ФГБОУ ВПО «Брянский государственный университет им. академика И.Г.Петровского»,
д.пед.наук., профессор

Т.А. Степченко

2014 года



ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертацию **Кулешовой Екатерины Сергеевны «Выделение антибиотических веществ из разных сортов ячменя и исследование их биологического действия»**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05.-физиология и биохимия растений.

Актуальность темы

Диссертационная работа Кулешовой Е.С. связана с проблемой поиска веществ растительного происхождения, обладающих антибиотической активностью, и изучением их физиологической активности. Хотя сам факт существования гордецина известен довольно давно, его структура до сих пор не установлена, а свойства и физиологическая активность практически не изучены.

Зарубежные фармацевтические фирмы в последние десятилетия стали снаряжать экспедиции и проводить активный скрининг растений различных флористических областей с целью поиска новых классов антибиотиков и других физиологически активных веществ с использованием современной

аналитической аппаратуры. Это в значительной степени связано с кризисом в производстве и разработке новых антибиотиков в фармацевтической промышленности, не смотря на возрастающую потребность. Не менее актуальным является вопрос поиска новых экологически безопасных средств защиты растений.

Научная новизна состоит в том, что впервые проведен скрининг генотипов ячменя из коллекции ВИР им. Н.И. Вавилова на содержание антибиотических веществ. Разработана оригинальная методика выделения гордецина из малых проб зерна ячменя и подобраны условия высокоэффективной жидкостной хроматографии для очистки гордецина. Впервые установлено, что развитие плесени на корнях различных генотипов ячменя связано обратной зависимостью с содержанием гордецина в зерновках. Показано, что гордецин снимает ингибирующее действие возбудителя корневых гнилей *Fusarium oxysporum* на рост корня проростков гороха, причем этот эффект может быть связан с влиянием гордецина на активность ферментов антиоксидантной системы проростков.

Практическая и теоретическая значимость результатов

Представленные в диссертации результаты позволяют считать гордецин перспективным веществом для дальнейших исследований, как антибиотика и потенциального средства защиты растений. Такое заключение базируется на доказательствах антибиотической активности гордецина по отношению к бактерии рода *Klebsiela* и ингибировании роста плесени на корнях ячменя, а также на обнаруженном эффекте снятия угнетающего действия *Fusarium oxysporum* на проростках гороха.

Кроме того, проведен скрининг сортов ячменя из коллекции ВИР по содержанию гордецина, установлено, что содержание гордецина в различных сортах и формах может различаться примерно на порядок. Выявлены образцы с максимальным содержанием гордецина, перспективные для его выделения и для селекции на дальнейшее повышение содержания этого вещества.

Значительный теоретический интерес могут представлять данные о соответствии в воздействии гордецина, а так же инфицирования *Fusarium oxysporum* на рост проростков гороха и их влиянием на активность супероксиддисмутазы, пероксидазы и каталазы в проростках, что позволяет предположить участие антиоксидантной системы в механизме реализации защитного действия гордецина.

Материалы диссертационной работы могут быть использованы в учебном процессе в курсе физиологии и биохимии растений и при выполнении курсовых и дипломных работ.

Полученные Кулешовой Е.С. данные важны для таких отраслей науки, как **физиология и биохимия растений**, а также **биотехнология**.

Структура и содержание диссертации.

Диссертационная работа Кулешовой Е.С. изложена на 157 страницах, построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка литературы, включающего 140 источников, и приложения. Работа иллюстрирована 6 таблицами и 24 рисунками и содержит 5 приложений.

Материалы диссертации апробированы на научных конференциях, отражены в 17 научных публикациях, в том числе 4-х изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

Во введении обосновывается выбор темы, доказывается её актуальность, формулируются цель и задачи исследования. Нужно отметить, что цель сформулирована не совсем удачно, по сути, только как скрининг коллекции на концентрацию гордецина, хотя содержание диссертации гораздо шире и охватывает физиолого-биохимические аспекты изучения гордецина, что отражено в формулировке задач работы.

Во второй главе «Обзор литературы» собраны основные сведения о ячмене, как объекте исследования, его хозяйственном значении и его

биохимические характеристики. Представлены сведения о механизмах и основных компонентах сигнальной системы устойчивости растений, роли окислительных-антиокислительных реакций в этой системе. Приведены также некоторые данные об антибиотических веществах и их действии на живые организмы. В целом обзор литературы позволяет подтвердить актуальность темы и выбор объектов и подходов для диссертационной работы, дает представление о степени изученности вопроса. В то же время, сведения о том, что известно о гордецине из предыдущих исследований, практически не представлены. Особенно хорошо написан раздел посвященный защитной системе растений. Наиболее слабо – раздел об антибиотиках. Преобладает литература 60-х и 70-х годов, имеются неточные сведения.

Третья глава представляет собой описание объектов и методов исследования. Объектами явились 14 образцов ячменя разного эколого-географического происхождения с различной степенью устойчивости к патогенам. В этом разделе дается описание основных методов биохимического исследования: определение активности пероксидазы, каталазы, супероксиддисмутазы; даны методы выделения гордецина и его очистки с помощью ВЭЖХ, даны условия масспектрофотометрии. Описаны методы выделения антибиотиков из плесени ячменя.

В четвертой главе представлены результаты работы и их обсуждение.

В частности, подобраны условия для экстракции и очистки гордецина с помощью ВЭЖХ. Получен масс-спектр очищенной фракции. Это открывает новые возможности для установления структуры гордецина при дальнейшей работе. Вместе с тем вывод о том, что в ходе измерения масс-спектра произошло окисление гордецина (отличие массы на 16 единиц от литературных данных), кажется сомнительным, поскольку используется бескислородный газ-носитель, а при электронном ударе скорее возможно восстановление, чем окисление. Масс спектрометрия была проведена только с карбонатной фракцией гордецина, выход которой при извлечении гордецина значительно выше, чем нейтральной. По-видимому, в

нейтральной фракции содержится «неокисленный» гордецин, а в карбонатной - «окисленный», обладающий более сильными кислотными свойствами и скорее всего представляющий собой другую форму гордецина.

Определен выход гордецина из различных сортов ячменя и приведена зависимость количества плесени на корнях – при повышении содержания гордецина количество плесени уменьшается, что косвенно свидетельствует о наличии антибиотической активности у этого вещества.

Связать содержание гордецина в семенах с устойчивостью сортов ячменя к полеганию и болезням стеблей и листьев не удалось. Это вполне логично, поскольку содержание гордецина при развитии проростков быстро падает, а о содержании его в листьях взрослых растений ничего не известно.

В последующих разделах представлены результаты изучения микробиологической обсемененности зерновок и идентификации некоторых микроорганизмов на них и в корневой плесени ячменя. Кроме того обнаружено, что в плесени содержатся по крайней мере 4 антибиотика, продуцентами которых, возможно, являются актиномицет рода *Streptomyces* и бактерии р.*Bacillus*.

В этой части диссертации сомнение вызывает обнаружение *Klebsiella pneumoniae*. Ризосфера ячменя и семена ячменя никак не могут считаться её нормальным местообитанием. Если это единичная находка, то это, скорее всего загрязнение от персонала лаборатории. Если эта бактерия присутствует во многих образцах, то, скорее всего, речь идет о схожих почвенных или филосферных грамм-отрицательных бактериях, возможно даже, что это родственная эндофитная бактерия, например, *Klebsiella planticola*. Это объясняет «удовлетворительную» идентификацию прибором, который просто «подгоняет» результаты под имеющуюся у него базу медицинских данных, поскольку медицинские анализаторы не рассчитаны на идентификацию всего разнообразия сапрофитной или фитопатогенной микрофлоры. В любом случае такие находки нужно тщательно проверять и доказывать.

Наиболее интересны разделы диссертации, посвященные изучению действия гордецина и вытяжки из плесени на рост проростков гороха и активность антиоксидантных ферментов при заражении *Fusarium oxysporum*. Показано, что вытяжка из плесени, содержащая антибиотики, и инокуляция патогена оказывают ингибирующий эффект на рост и активность ферментов, то эффект гордецина совершенно уникальный, мало сказать, что он снимает действие патогена в инфицированных проростках, при этом почему-то исчезает его собственное довольно сильное угнетающее действие на проростки. Изучить эти механизмы в дальнейшем было бы очень интересно.

К сожалению приведенная в диссертации оценка достоверности (под рисунками указано: $n=3$; $P \leq 0,05$) не соответствует способу представления данных, поскольку предполагает достоверность сравнения только с одним контролем, а на гистограммах присутствуют контроли для каждого возраста проростков и, кроме того, необходимо сравнивать другие столбики между собой. В этом случае необходимо указывать доверительные интервалы для данного уровня значимости для каждого столбика отдельно – и все они будут разными, а не одинаковыми, как на рис.1 автореферата. Но поскольку, различия в длинах проростков и активностях ферментов (кроме каталазы) довольно велики, и обнаруженная закономерность повторяется при разном возрасте проростков, для разных ферментов и для длины проростков, то можно заключить, что обнаруженные закономерности существуют объективно, то есть достоверны и **выводы сделаны на основе достоверных данных.**

Помимо указанных дискуссионных моментов, необходимо отметить следующие недостатки:

1. В диссертации имеются не выправленные опечатки и неудачные выражения

2. В списке литературы, помимо отклонений от ГОСТа, имеются описания ссылок вообще без названия статьи, журнала или того и другого, например, под номерами 88, 90, 94, 96, 97, 99, 101, 102, 103, 104, 110

3. Нигде не сказано, как мерили объем плесени. На графике зависимость объема плесени (в мл/г) от сорта (рис.17). В таблице 6 в названиях колонок значится только удельный объем мицелия, а при обсуждении таблицы 6 на стр.98 сказано, что масса плесени у некоторых образцов не велика 1 – 3 мг/мл. Все-таки объем или масса, и в мг чего на мл чего?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, с учетом актуальности, новизны и значимости, можно заключить, что диссертационная работа «Выделение антибиотических веществ из разных сортов ячменя и исследование их биологического действия» Екатерины Сергеевны Кулешовой является законченной самостоятельной работой, направленной на решение важных задач, связанных с изучением системы иммунитета растений, а также перспективами поиска новых антибиотиков и разработки препаратов для защиты растений и соответствует критериям, установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней» № 74 (в редакции постановления Правительства РФ от 20 июня 2011 г. № 475), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05-физиология и биохимия растений.

Отзыв утвержден на заседании кафедры биологии.

Протокол № 1 от 09.06.2014 года.

Профессор кафедры биологии ФГБОУ
ВПО «Брянский государственный университет
им. академика И.Г. Петровского»,

доктор биологических наук *Заякин* Заякин Владимир Васильевич
241524, Брянский р.-н., п.Мичуринский
ул. Юбилейная, 5, кв.1 тел. 8(919) 982581

