

ОТЗЫВ

официального оппонента д.б.н. Скупченко Владимира Борисовича на диссертацию Арбичевой Алисы Игоревны «Структурно-функциональная организация листьев у некоторых представителей порядка *Araucariales*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 - «Ботаника».

Рассматриваемая работа посвящена актуальной проблеме экологической анатомии растений – функциональному значению долгоживущих плоских листовых пластинок подокарповых и араукариевых в системе растительного организма. У голосеменных водопроводящая система представлена архаичной ксилемой, которая состоит из замкнутых клеток – трахеид, сообщающихся между собой через поры, скорость проведения воды по такой ксилеме значительно ниже, чем у цветковых растений, проводящими элементами ксилемы которой являются сосуды. Поэтому представляет интерес вопрос, как у подокарповых и араукариевых организован лист, интегрированный с примитивной ксилемой, а также в какой степени в эволюции листа покрытосеменных и голосеменных выражено явление параллелизма (конвергенции). Поскольку функциональное значение долгоживущих листьев подокарповых и араукариевых в системе растительного организма не изучено, в рассматриваемой работе поставлены цель и задачи исследования – дать характеристику структурно-функциональной организации долгоживущих листьев голосеменных растений, дифференцированных на черешок и пластинку.

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списков используемых сокращений и цитируемой литературы. Текст диссертации изложен на 187 страницах, включает 16 таблиц и 45 рисунков. Список литературы содержит 365 источников, из которых 323 – на иностранных языках.

В главе 1 «Обзор литературы» выполнен обширный анализ литературных данных, характеризующих объекты исследования: род *Agathis* Salisb., семейство *Podocarpaceae* Endl., структурные особенности представителей сем. *Podocarpaceae*., экологические особенности сем. *Podocarpaceae* и некоторых сопутствующих Покрытосеменных, семейство *Winteraceae* R. Br. ex Lindl., водный режим листа, сравнительные структурно-функциональные исследования листьев разного возраста у древесных растений.

Глава 2 Материалы и методы

Растительный материал видов *Agathis brownii* (Lem.) L. H. Bailey и *Agathis vitiensis* Benth. & Hook. f. ex Drake (*Araucariaceae* Henkel & W. Hochst.) собирали с января 2008 г по сентябрь 2018 г в Ботанических садах Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН и Санкт-Петербургского государственного университета. Материал видов *Podocarpus nubigenus* Lindl., *Podocarpus salignus* D. Don., *Prumnopitys andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub., *Saxegothaea conspicua* Lindl. (*Podocarpaceae* Endl.), *Drimys andina* (Reiche) R. A. Rodr. & Quezada и *Drimys winteri* J. R. Forst. & G. Forst. (*Winteraceae* R. Br. ex Lindl.) собирали в ноябре 2015 г в национальных парках *Parque Nacional Nahuelbuta* и *Parque Nacional Puyehue* (южная часть Центрального Чили), а также с 2015 по 2018 гг. в Ботаническом саду Ботанического института им. В. Л. Комарова РАН. Номенклатура дана в соответствии с базой данных *The Plant List* (2013) и работой М. J. M. Christenhusz с соавт. (2011).

В качестве модельного объекта для оценки возрастных изменений в строении листьев использовали *A. brownii*.

Представлены сведения по Географическому положению и аутэкологическим характеристикам мест сбора материала в южной части Центрального Чили.

В своей работе диссертант освоила и использовала современные методы анатомического исследования объектов с применением для световой микроскопии, способов изготовления срезов листьев ручным микротомом, срезов древесины замораживающим санным микротомом, а также на криостат-микротоме. Применила современную технику для просмотра и фотографирования микропрепаратов – микроскоп DM1000 с цифровой камерой EC3, инвертированный микроскоп DMI 3000B, лазерный конфокальный сканирующий микроскоп Leica TCS SP5.

Важный положительный момент анатомического исследования в данной работе – использование компьютерных программ для редактирования изображений объектов и их морфометрического анализа. Рассмотрено 50 признаков, характеризующих морфологию листа, а также строение эпидермы, мезофилла, тканей черешка и 14 признаков, характеризующих строение трахеид и радиальных лучей, а также площадь поперечного сечения древесины, занятую трахеидами.

Для исследования объектов применена трансмиссионная электронная микроскопия, а также сканирующая электронная микроскопия. Гистохимически определено присутствие суберина и конденсированных таннинов.

Проведено изучение физиологических характеристик листа, включающее бесконтактный оптический метод определения содержания хлорофиллов; спектрофотометрическое определение содержания хлорофиллов и каротиноидов; определение поглощения ^{14}C -сахарозы из апопласта. Выполнено измерение интенсивности фотосинтеза, транспирации и газообмена; измерение оводненности разновозрастных листьев.

Проведена математическая обработка данных.

Определены аутоэкологические показатели мест сбора материала.

Глава 3. Рост и развитие долгоживущих листьев голосеменных растений на примере рода *Agathis*.

В данной главе представлен материал по росту листа *Agathis brownii*. В частности установлено, что рост листьев *Agathis brownii* длится более четырех месяцев при максимальной скорости 2,6 мм/сут. Кривая роста имеет несимметричный сигмоидный характер и описывается функцией Гомпертца. Максимальное ускорение роста составляет 0,11 мм/сут² и достигается на 20-й день от начала роста, при размере листового зачатка около 7% от окончательного.

При анализе роста листа следовало оценить влияние на него важного экологического фактора – температуры.

Выполнено подробное анатомическое изучение гистогенеза эпидермы развивающегося листа и устьичного аппарата с применением световой и электронной трансмиссионной и сканирующей микроскопии.

Установлено, что устьица в эпидерме растущего листа закладываются в несколько этапов. В ней одновременно присутствуют интенсивно растягивающиеся вдоль продольной оси пластинки клетки и расположенные между ними активно делящиеся клетки. Плоскость деления последних проходит перпендикулярно продольной оси пластинки. Часть из них развиваются в материнские клетки замыкающих клеток устьиц (меристемойды), что приводит к возникновению закономерно расположенных рядов устьиц, продольные оси которых также перпендикулярны длинной оси листа. Латеральные побочные клетки имеют с меристемойдом общее происхождение, а полярные возникают в результате делений соседних клеток эпидермы. Таким образом, устьичный аппарат *A. brownii* относится к мезоперигенному типу по классификации D. D. Pant (1965).

После возникновения замыкающих клеток активизируется их рост, который, как и у меристемоида, сосредоточен в базальной, обращенной к мезофиллу, части. По мере роста замыкающих клеток их треугольная на поперечном срезе форма сменяется на округлую, устьице вырастает под побочные клетки, на поверхности которых в виде выпирающей складки образуются папиллы, формирующие кольцо Флорина. Результатом описанных процессов является возникновение тетрацитного устьичного аппарата.

В данном разделе следовало пояснить интерпретацию термина пластохронный индекс листа – это отрезок времени между закладкой листовых зачатков на апексе побега, либо что иное.

Также весьма полезно было бы для оценки функционального состояния клеток формирующегося устьичного комплекса применить морфометрический анализ ультраструктуры их протопласта.

В разделе «Строение сформированного листа» представлены статистические характеристики 37 признаков строения сформированного листа *Agathis brownii*. Дано подробное описание морфологии и анатомии листа микрофотографии его тканей.

Установлено, что пластинка очень толстая, ее толщина около 400 мкм. Мезофилл многослойный (~8 слоев), дорзовентральный. Коэффициент палисадности низкий (37%). Мезофилл очень рыхлый (степень рыхлости ~45%). Стенки клеток губчатой ткани несут со стороны межклетников пектиновые бородавки. Жилкование дуговое. На одном уровне с проводящими пучками, чередуясь с ними, находятся секреторные ходы. Они заполнены эфирными маслами. Наружная стенка основных эпидермальных клеток очень толстая. В ней и в кутикуле откладываются кристаллы, представляющие собой, по-видимому, оксалат кальция. Лист гипостоматный. Устьица тетрацитного типа, располагаются прерывающимися рядами. Замыкающие клетки лежат ниже поверхности листа. Побочные клетки погружены под вечночные, их наружные тангентальные стенки образуют складки, в которые заходит протопласт. Смыкаясь между собой, эти складки формируют кольцо Флорина, окаймляющее на поверхности листа полость, на дне которой находится устьичная щель. Эти полости могут быть закупорены.

3.3. Изменчивость и корреляции признаков строения сформированного листа

3.3.1. Общая и согласованная изменчивость признаков

Установлено, что средняя величина коэффициента детерминации (r^2) для изученных признаков составила 0,155. Оценка общей (cv) и согласованной (r^2) изменчивости признаков обнаруживает относительную стабильность и автономность плотности жилкования и размещения секреторных ходов, числа устьиц на единице площади эпидермы и устьичного индекса, «перфорированности» ксилемы в черешке просветами трахеид. Наиболее же изменчивы и тесно связаны в своих изменениях с остальными признаками листа площадь его пластинки, степень развития столбчатой ткани в ее мезофилле и ксилемы в черешке.

Корреляции признаков.

Сопоставление листьев из кроны *A. brownii* показало, что для наиболее крупных из них характерен больший объем ксилемы в черешке, увеличение числа входящих в ее состав трахеид и просветов их полостей, пониженное отношение площади листовой пластинки к площади ксилемы на поперечном срезе черешка, т.е. сокращение транспирационной поверхности относительно водопроводящей.

3.4. Возрастные изменения листьев

Строение разновозрастных листьев.

Обнаружено, что в пластинке листа *Agathis brownii* с возрастом увеличивается число и размер пектиновых бородавок на стенках клеток губчатой ткани, растет число клеток, вакуоли которых заполнены танинами. В тканях черешка и пластинки листьев возрастом старше двух лет происходит накопление кристаллов, предположительно, оксалата кальция. Проводящие пучки черешка не обладают активным вторичным ростом. По мере старения листьев агатиса объем функционирующей флоэмы постепенно сокращается. Уменьшение происходит в результате деформации и последующего смятия наиболее старых клеток, расположенных во внешних частях пучков. Со временем смятые ситовидные клетки полностью утрачивают свои полости.

Для листьев *A. brownii* и *A. vitiensis* характерно образование перидермы. Процесс начинается в первый-третий год жизни листьев. Данная ткань появляется обычно в верхней части черешка возле пластинки; реже – в ее основании, или в виде нерегулярных полос или пятен в центральной части пластинки. Расположение перидермы в листьях изученных видов многообразно. Она может возникать из эпидермальных клеток и покрывать локальные участки листа, или располагаться дугообразно, отсекая участки эпидермы и подстилающих ее клеток мезофилла или основной ткани черешка. Изолируемые группы клеток отличаются активным накоплением танинов. При дугообразном заложении феллогена делениям могут подвергаться клетки паренхимы проводящих пучков. Обнаружены случаи кольцеобразного заложения феллогена. В зоне перехода черешка в пластинку наиболее старых отмирающих листьев *A. brownii* отмечены случаи многократного поперечного заложения перидермы. В результате лист рассекается на фрагменты, некоторые из которых подвергаются некрозу. Выявлено два варианта организации перидермы. Она может иметь типичное для этой ткани строение. В этом случае перидерма состоит из феллогена, клетки которого содержат крупные ядра, многослойной феллемы и феллодермы. Возможен и иной вариант, когда все производные клеточных делений суберинизируются. Присутствие суберина выявлено с помощью флуоресцентного окрашивания. Листья агатиса также способны к образованию полноценной раневой перидермы, что было показано экспериментально.

Физиологические характеристики разновозрастных листьев.

Установлено, что старые листья в кроне *A. brownii* находятся в условиях худшей освещенности по сравнению с листьями последнего года прироста. Для них характерно уменьшение оводненности, снижение соотношения хлорофиллов а и б, падение интенсивности фотосинтеза, а также повышенное содержание фотосинтетических пигментов. В экспериментах с мечением жилок разновозрастных листьев агатиса ^{12}C -сахарозой и ^{14}C -сахарозой, метка интенсивно проявлялась в жилках листьев первого года, в то время как жилки листьев семилетнего возраста оставались практически немечеными. Это свидетельствует о том, что интенсивность процессов загрузки сахарозы в жилки у старых листьев крайне низка.

3.5. Возрастные изменения древесины

Раздел содержит сопровождаемые таблицей микрофотографий описания вторичной ксилемы однолетнего побега, многолетней ветки и ствола *Agathis brownii*. Сопоставление разновозрастных образцов показывает, что на рассматриваемом отрезке онтогенеза происходит увеличение площади поперечного сечения древесины, занятой трахеидами, их длины, толщины стенок и диаметра наружных отверстий пор, а утолщенность трахеид снижается. Одновременно растет степень паренхиматизации древесины за счет увеличения числа лучей, их слойности, величины клеток.

Глава 4. Сравнительный анализ структурно-функциональной организации листьев гомоксиларных древесных видов растений умеренного дождевого леса южной части Центрального Чили

4.1. Строение листа

Приводится описание морфологии и анатомии листьев гомоксилярных древесных видов растений умеренного дождевого леса южной части Центрального Чили: 1 – *Podocarpus nubigenus*, 2 – *P. salignus*, 3 – *Prumnopitys andina*, 4 – *Saxegothaea conspicua*, 5 – *Drimys andina*, 6 – *D. winteri*.

Представлены фото общего вида листьев указанных растений;

цветные микрофотографии световой микроскопии общей анатомии листьев, включающие структуры: 1 – поперечный срез пластинки; 2 – расположение трансфузионной ткани относительно жилки (поперечный срез); 3 – трансфузионная трахеида; 4 – верхняя эпидерма; 5 – устьичный аппарат (парадермальный план); 6 – устьичный аппарат (поперечный срез).

Показано строение листа на ультраструктурном уровне включающие структуры: 1 – хлоропласт клетки палисадной ткани, 2 – хлоропласт клетки губчатой ткани, 3 – хлоропласт клетки водозапасающей ткани, 4 – трахеида трансфузионной ткани, 5 – клеточная стенка трансфузионной трахеиды, 6 – устьичный аппарат.

По каждому виду дана таблица результата морфометрической обработки структур листа по 40 статистическим показателям признаков строения листа этих видов.

4.2. Физиологические характеристики

По 6 чилийским видам гомоксилярных древесных растений определена освещённость мест произрастания исследованных экземпляров; физиологические характеристики листьев: среднее значение относительного содержания хлорофилла; световой компенсационный пункт; начало светового насыщения видимого фотосинтеза мкмоль фотонов/(м²с); интенсивность фотосинтеза при насыщающем свете мкмоль CO₂/(м²с); мгновенная эффективность использования воды данного вида мкмоль CO₂/ммоль H₂O, внутренняя – мкмоль CO₂/ммоль H₂O.

На основе сопоставления факторной структуры признаков строения листа гомоксилярных видов умеренного дождевого леса южной части Центрального Чили установлены следующие характеристики. Для крупных листьев характерны большой объем проводящих тканей в черешке, более широкопросветные трахеиды в его ксилеме. Мезофилл в таких листьях многослойный с выраженной палисадной тканью. Устьица в нижней эпидерме расположены относительно часто. Отмеченное сочетание признаков в наибольшей степени выражено у *D. winteri*. В свою очередь, у листьев с небольшой пластинкой снижен объем ксилемы и флоэмы в черешке, а трахеиды имеют узкие просветы. Число слоев мезофилла небольшое, палисадная ткань развита слабо. Плотность устьиц также невелика. Перечисленные черты строения свойственны, прежде всего, для *P. nubigenus* и *S. conspicua*, видов, часть мезофилла которых преобразована в водозапасающую ткань. *D. andina*, *P. andina* и *P. salignus* занимают по обсуждаемым признакам промежуточное положение. В число признаков, характеризующих структурные элементы, обеспечивающие газообмен листа, входят количество устьиц, удельный вес палисадной ткани в мезофилле и биомасса фотосинтетических органов. По рассматриваемому комплексу выделяется *S. conspicua*, в пластинке листа которой крайне слабо выражена палисадная ткань, мезофилл очень плотный, а количество устьиц на единицу сухого веса максимально среди исследованных видов. Для *P. andina* и *P. salignus*, напротив, характерны малое число устьиц на единицу сухого веса пластинки, малый устьичный индекс, редко расположенные устьица и хорошо развитая палисадная ткань.

В результате выполненной работы получены следующие выводы.

1. Листьям *Agathis brownii* свойствен продолжительный (более 4 месяцев) медленный (максимальная скорость 2,6 мм/сут) рост, описываемый функцией Гомпертца. С возрастом в листьях агатисов увеличивается число клеток, в которых накапливаются танины;

интенсифицируется отложение кристаллов в клеточных оболочках. По мере старения листьев их вклад в обеспечение растения ассимилятами ослабевает. При этом снижается уровень фотосинтеза, падает интенсивность загрузки жилок его продуктами, сокращается число активно функционирующих ситовидных клеток во флоэме черешка.

2. Для листьев агатисов характерно образование перидермы. Группы клеток, отсекаемые в ходе заложения данной ткани, могут служить местом хранения для соединений, не включенных в метаболизм растения или исключенных из него. Перидерма изолирует в долгоживущих листьях вечнозеленых растений клетки, аккумулирующие такие соединения, от ассимиляционной и проводящей тканей пластинки.

3. Листья подокарповых умеренного дождевого леса южной части Центрального Чили мелкие (микрофиллы и нанофиллы), толстые, с многослойным мезофиллом дифференцированного типа, преимущественно гипостоматные, с устьицами, как правило, тетрацитного типа. Различия листьев разных видов основываются на тканевом составе мезофилла, соотносительном развитии его структурных элементов, строении проводящей системы.

4. Выделено два типа структурной организации листьев подокарповых умеренного дождевого леса южной части Центрального Чили. Первый из них специализирован на интенсификации проведения воды через лист, что достигается с помощью специализированных трахеид трансфузионной ткани и добавочной трансфузионной ткани (*Podocarpus salignus*) или значительного развития палисадной ткани, способствующего транспорту воды по апопласту (*Prumnopitys andina*). Данный тип структурной специализации сочетается с интенсивной транспирацией, высокой устьичной проводимостью, интенсивным фотосинтезом. Второй тип структурной организации листьев подокарповых характеризуется наличием в них гидренхимы, обеспечивающей водозапасаение. Обладающим этой тканью видам (*Podocarpus nubigenus*, *Saxegothaea conspicua*) свойственны пониженные интенсивность транспирации, устьичная проводимость и интенсивность ассимиляции.

5. В строении листьев подокарповых умеренного дождевого леса южной части центрального Чили выражены черты конвергентного сходства с листьями покрытосеменных растений. Они проявляются не только в общем плане их строения, но и в наличии у части подокарповых гидренхимы, а также аналогичной латеральным жилкам листьев цветковых растений добавочной трансфузионной ткани.

В заключение следует отметить, что при выполнении исследования долгоживущих плоских листовых пластинок подокарповых и араукариевых диссертант проявила высокую квалификацию в области экологической морфологии и анатомии. Показала высокий уровень компетенции современного состояния изученности проблемы исследования по данным отечественной и зарубежной литературы. Применила большой набор методов исследования: обычную световую микроскопию, лазерную конфокальную микроскопию, электронную трансмиссионную и сканирующую микроскопии, гистохимический метод определения локализации в веществах тканях, физиологический анализ параметров фотосинтеза и водного режима, включение меченой ^{14}C -сахарозы жилок разновозрастных листьев, метод морфометрии и способ оценки факторной структуры признаков строения листа. Проявила самостоятельность в постановке задач исследования, в анализе результатов и формулировке теоретических и практических выводов.

Рассматриваемая диссертация по теме «Структурно-функциональная организация листьев у некоторых представителей порядка *Araucariales*» посвящена актуальной проблеме экологической морфологии и анатомии растений и вносит существенный вклад в расширение представлений о функциональном значении долгоживущих плоских листовых пластинок подокарповых и араукариевых в системе растительного организма.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, достоверны и обоснованы большим новым экспериментальным материалом.

Автореферат содержит исчерпывающую информацию основных положений диссертации.

Выявленные замечания не снижают положительной оценки выполненной диссертационной работы.

Диссертация соответствует критериям п. 9, установленным «Положением о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Арбичева Алиса Игоревна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.01 – «Ботаника».

Скупченко Владимир Борисович,
доктор биологических наук
(специальность 03-02-01 – «Ботаника»),

Профессор, профессор кафедры общей экологии,
анатомии и физиологии растений
Института леса и природопользования

Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский
государственный лесотехнический
университет имени С.М. Кирова»

E-mail: vlask@VS16579.spb.edu

В.Б. Скупченко



«Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова»
адрес: 194021, г. Санкт-Петербург, Институтский пер., д. , 5, литер У.

Тел. 812 670-92-40

E-mail: public@spbfti.ru

20 апреля 2020 г