

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Карпеченко Никиты Александровича «Анализ белковых спектров ферментов метаболических путей и инвертированных повторов ДНК древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в лесостепи европейской части Российской Федерации», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы кандидатской диссертации Карпеченко Никиты Александровича «Анализ белковых спектров ферментов метаболических путей и инвертированных повторов ДНК древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в лесостепи европейской части Российской Федерации» не вызывает сомнений, так как она посвящена изучению биохимико-генетических параметров полиморфизма популяций древесных растений и их особенностей, которые в значительной мере обусловлены происхождением растений.

В настоящее время наиболее остро стоит проблема сохранения и восстановления биоразнообразия основных лесообразующих пород древесных растений. К таким растениям относится дуб черешчатый (*Quercus robur* L.). Изучение полиморфизма белкового спектра и молекулярных маркеров ДНК в популяции древесных растений позволяет решать задачу поиска путей сохранения биоресурсов, предотвращения истощения генофонда, что является актуальной задачей не только биохимии, но и молекулярной биологии.

Анализ изменений, происходящих как в аминокислотной, так и в нуклеотидной последовательности в настоящее время приобретает всё большее значение в популяционно-генетических исследованиях, таких как изучение биоразнообразия видов, выявление субпопуляционных структур внутри одной популяции и путей их миграции.

Научная новизна работы заключается в расширении представлений о механизмах адаптации растений к различным условиям произрастания, связь

этих процессов с изменением биохимических и молекулярно-биологических показателей, что характеризует формирование определенной генетической структуры популяции. Анализ изменения биохимических и молекулярно-биологических параметров, проведенный автором на примере дуба черешчатого, произрастающего в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации, показал, что популяция не является абсолютно однородной структурой.

Никитой Александровичем показано, что отклик ферментативной и генетической систем на воздействие изменяющихся параметров окружающей среды активизирует адаптационные механизмы, оказывающие влияние на преобразование белкового и генетического состава растительного организма. В зависимости от условий мест произрастания дуба черешчатого формируются группы особей, характеризующиеся более схожим белковым спектром ферментов и молекулярных маркеров, что дало автору возможность выделить различные экотипы внутри популяции.

Практическая значимость выполненной работы связана с получением данных об изменении спектра биохимических маркеров, что позволяет проводить мониторинг популяционной структуры древесных растений, выявлять происходящие при этом эволюционные процессы, их направленность и значимость для вида.

Результаты, полученные автором диссертационной работы могут быть использованы в лесоисследовательских лабораториях для изучения пространственной структуры насаждений дуба черешчатого с целью проведения лесосеменного районирования, а также для создания лесосеменной базы дуба черешчатого в целях лесовосстановления и лесоразведения.

В дальнейшем возможно применение изученных биохимических маркеров для диагностики и мониторинга популяционной структуры других видов древесных растений.

Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список использованных источников», «Приложение». Работа содержит 29 рисунков и 9 таблиц. Список литературы включает 181 источник, в т.ч. 79 – на иностранных языках. Структура работы традиционна для подобного рода исследований.

Для выполнения цели и задач диссертационной работы Никита Александрович использовал современные методы физико-химической и молекулярной биологии: спектрофотометрирование, электрофоретические исследования, RAPD-анализ и методы компьютерной биологии. Для анализа степени подразделенности природных популяций дуба черешчатого автором использовались коэффициенты, предложенные Райтом (F-статистики) и Неи (G-статистики). Используемые автором параметры, а также частоты встречаемости аллелей, позволили ему описать генетическую и генотипическую структуру, выявить уровень генетической изменчивости, дав тем самым возможность оценить состояние генофонда исследуемых популяций.

Результаты и их обсуждение включают в себя 5 глав.

В главе «Изучение полиморфизма изоферментного состава в популяции дуба черешчатого» автор приводит обширный экспериментальный материал, посвящённый изоферментному анализу метаболических путей деревьев дуба черешчатого из 14 климатипов. В ходе исследований использовалось 8 генферментных систем, кодирующихся 12 локусами, а именно: алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2), изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42), фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1), глюкозофосфатизомераза (GPI, КФ 5.3.1.9), шикиматдегидрогеназа (SKDH, КФ 1.1.1.25), лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1), флюоресцентная эстераза (Fl-EST, КФ 3.1.1.2).

В ходе исследования изоферментного состава автором было выявлено разное число аллельных вариантов: от 23 (Респ. Татарстан) до 27 (Респ. Чувашия, Белгородская обл., Воронежская обл. и Респ. Марий Эл). Всего в изученных образцах дуба черешчатого обнаружено 33 аллеля.

Никитой Александровичем было установлено, что в большинстве климатипов практически в каждом локусе преобладает наиболее общий аллель 1.00. В то же время в некоторых насаждениях по ряду локусов с большой частотой встречаются другие аллели: Pgm0.90, Alap-10.90 и Alap-21.05. Выявлено, что наиболее изменчивыми локусами являются: Alap-1, Alap-2, Lap и Pgm, ожидаемая гетерозиготность по которым составила более 34%.

Полученные автором данные электрофореграмм по полиморфизму белкового спектра исследуемых ферментов у дуба черешчатого показывают, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее подходящими являются 6: алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза. При этом было продемонстрировано, что данные ферменты проявляют высокую вариабельность в своём белковом спектре в отличие от глюкозофосфатизомеразы и шикиматдегидрогеназы.

Следующая глава диссертационной работы посвящена определению характера изменения ДНК-маркеров в популяции дуба черешчатого различных мест произрастания. Автором была проведена оптимизация метода выделения геномной ДНК из растительных тканей, что добиться стабильного получения недеградированных препаратов растительной ДНК. Концентрация полученных препаратов ДНК из дуба черешчатого в среднем составляла от 0,5 до 0,9 нг.

Выявление изменения структуры ДНК в популяции дуба черешчатого осуществляли с помощью RAPD-анализа. Изменчивость инвертированных повторов проводили с использованием 4 RAPD-праймеров Oligo 16, Oligo 29,

Oligo 4, Oligo, выделенные автором как наиболее информативные при популяционном анализе у дуба черешчатого.

На основании полученных спектров ампликонов Никитой Александровичем составлялись усреднённые таблицы, отражающие наличие или отсутствие соответствующего ампликона у групп образцов разных мест происхождения, характерного для каждого из праймеров (наличие ампликона обозначалось цифрой 1, отсутствие цифрой 0), с целью дальнейшего обсчета с помощью программного обеспечения POPGENE.

Полученные автором результаты ПЦР показали высокую вариабельность и информативность. Число амплифицированных фрагментов ДНК варьировало в зависимости от праймера от 6 (праймер Oligo 4, Oligo 6) до 8 (праймер Oligo 16, Oligo 29), а их размеры – от 300 до 3000 пн.

Глава «Полиморфизм ДНК-маркеров дуба колоновидного» описывает результаты анализа изменчивости инвертированных повторов с использованием 9 RAPD-праймеров (Oligo 1, Oligo 2, Oligo 3, Oligo 4, Oligo 5, Oligo 6, Oligo 12, Oligo 19, Oligo 29). При проведении детального анализа спектров ампликонов по каждому из праймеров для каждой группы дубов была показана высокая степень вариабельности спектра ампликонов внутри каждой выборки.

Автором было обнаружено, что праймер Oligo 5 является индикатором колоновидной формы кроны в семенном потомстве от дуба черешчатого с колоновидной формой кроны г. Воронежа. Это является весьма значимым показателем, поскольку, как известно, при семенном способе размножения у потомства пирамидального дуба идет расщепление по форме кроны, причём процент расщепления колеблется от 30% до 70%. Особого внимания заслуживает и тот факт, что фенотипическое разделение по форме кроны у семенного потомства дуба колоновидного проявляются только к 4–5 годам роста и до этого момента они выглядят одинаково.

Следующий раздел диссертационной работы посвящен анализу изменения биохимических показателей популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации. В результате анализа генотипов образцов дуба черешчатого с использованием изоферментного метода и метода ДНК-анализа, автором было обнаружено большое количество гомозигот по альтернативным аллелям и явный недостаток гетерозигот.

На основании полученных данных автором был проведён расчет основных параметров генетического полиморфизма. Было установлено, что доля полиморфных локусов варьирует от 0,583 до 0,833, составляя в среднем 0,750. Среднего число аллелей на локус составило 2,667. Расчет средней ожидаемой гетерозиготности (H_e), проведённый Никитой Александровичем, показал, что выявленные для исследованных климатипов дуба черешчатого значения H_e имеют широкий размах и находятся в пределах от 22,7% до 31,8%.

Таким образом, проведённое автором сравнение установленного на основе биохимико-генетического анализа уровня генетического разнообразия исследованных образцов дуба черешчатого с результатами популяционно-генетических исследований в других регионах позволило ему сделать вывод о том, показал, что в целом климатипы дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости.

Следующая глава содержит в себе анализ структуры популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации. На основании коэффициентов генетической дистанции H_{ei} Никитой Александровичем была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными климатипами дуба черешчатого.

Рассчитанный автором коэффициент F_{IS} находился в пределах от -0,014 до 0,700, составляя в среднем 0,318. Коэффициент F_{IT} равнялся в среднем 0,344. Положительные средние значения этих двух показателей говорят о большом недостатке гетерозигот, который существует в исследованных насаждениях

дуба черешчатого. Полученные значения показателей подразделенности F_{ST} и G_{ST} (0,041 и 0,054 соответственно) позволяют автору сделать вывод о том, что генетическая структура исследованных культур дуба черешчатого в целом неоднородна и на долю межпопуляционных различий приходится более 4%.

С использованием невзвешенного парно-группового анализа (UPGMA) на основе рассчитанных значений коэффициентов DN автором была построена дендрограмма для исследованных климатипов дуба черешчатого. На основании полученной дендрограммы автор предлагает условное разделение всей выборки дуба черешчатого на 3 больших кластера: 1 кластер (Республика Татарстан; Воронежская область, Воронцовское лесничество; Воронежская область, Теллермановское лесничество), 2 кластер (Республика Чувашия; Тульская область; Белгородская область, Алексеевское лесничество; Белгородская область, Шебекинский лесхоз; Республика Башкортостан; Брянская область; Курская область; Республика Марий Эл), 3 кластер (Самарская область; Республика Мордовия; Воронежская область, Воронцовское лесничество). При этом подобное деление в целом соответствует географическому расположению материнских насаждений, за исключением насаждений из первого кластера. На основании данных, приведённых в данной главе, автор составил карту границ популяционной структуры дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.

В заключении автор обобщает полученные им результаты и, на основании проведённого им изучения изменения биохимических показателей белкового спектра ферментов и молекулярных маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях различных мест обитания, делает вывод о том, что популяция дуба черешчатого в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации не является однородной структурой.

Применение автором биохимического анализа белкового спектра ферментов метаболических путей растительной клетки дуба черешчатого дало ему возможность говорить о том, что из 8 исследованных ферментов наиболее

подходящими для выявления белкового полиморфизма являются 6: алкогольдегидрогеназа (ADH, КФ 1.1.1.1), аланинаминопептидаза (ALAP, КФ 3.4.11.2), изоцитратдегидрогеназа (IDH, КФ 1.1.1.42), фосфоглюкомутаза (PGM, КФ 2.7.5.1), лейцинаминопептидаза (LAP, КФ 3.4.11.1), флюоресцентная эстераза (Fl-EST, КФ 3.1.1.2), поскольку данные энзимы проявляют высокую вариабельность в своём белковом спектре.

Молекулярно-биологический метод анализа на основе полимеразной цепной реакции с RAPD-праймерами позволил автору исследовать полиморфизм инвертированных повторов в геноме растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях различных мест обитания. Кроме того, изменение спектрального профиля амплифицированных фрагментов ДНК дуба черешчатого различных мест происхождения показало корреляцию с характером изменения белковых зон по климатипам. При этом автором было показано, что степень сходства климатипов дуба черешчатого по своим биохимическим показателям не зависит от пространственной удаленности климатипов друг от друга.

В целом выполненная диссертационная работа заслуживает высокой оценки. Вместе с тем, при анализе диссертации возникает ряд вопросов и замечаний, наиболее существенными из которых являются следующие:

1. С чем связан выбор метода электрофореза в крахмальном геле для изучения полиморфизма изоферментного состава?
2. Являются ли использованные в работе RAPD-праймеры оригинальной авторской разработкой или же представляют собой стандартное средство проведения популяционного анализа дуба черешчатого?
3. В чём, по мнению автора, состоит адаптивная роль полиморфизма изоферментного состава у различных климатипов дуба черешчатого?
4. К сожалению, из текста диссертации не совсем ясна судьба исследований, посвященных ассоциированию формоспецифичности кроны у дуба с наличием ампликона в области 300 пн при проведении RAPD-анализа с

использованием праймера Oligo 5. Продолжает ли автор исследования по данному вопросу? Отражены ли их результаты в форме патента?

Диссертация Карпеченко Никиты Александровича «Анализ белковых спектров ферментов метаболических путей и инвертированных повторов ДНК древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в лесостепи европейской части Российской Федерации» представляет собой законченный научный труд. Выводы диссертационной работы теоретически обоснованы. Диссертация хорошо оформлена. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы.

В целом диссертационная работа Карпеченко Никиты представляет собой законченное научное исследование. Работа полностью удовлетворяет требованиям ВАК РФ, а диссертант вполне заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

16 июня 2014 г.

Кандидат биологических наук, заведующий
лабораторией патобиохимии ГНУ ВНИВИПФиТ
РАСХН

 Фоменко О.Ю.

Почтовый адрес: 394087, г. Воронеж, ул.
Ломоносова, д. 114Б

раб. тел.: 8 (473) 253-65-94;

дом. тел.: 8 (473) 241-79-62;

e-mail: fomenych@rambler.ru

Подпись Фоменко О.Ю. заверяю: учёный

секретарь ГНУ ВНИВИПФиТ РАСХН, К.Б.Н.

доцент



Ермакова Т.И.