

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук,
д.б.н., профессор

Г. Б. Боровский

«19» июня 2014 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу 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 по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность исследования. Сохранение и восстановление биоразнообразия растений является одной из важнейших проблем во всем мире, поскольку именно разнообразие видов является главным условием сохранения устойчивости экосистем. Одним из направлений в решении проблемы сохранения биоразнообразия древесных растений является изучение биохимико-генетических параметров полиморфизма популяций и их особенностей, которые в значительной мере обусловлены происхождением растений. При изучении биоразнообразия видов, выявления субпопуляционных структур внутри одной популяции и путей их миграции все большее значение приобретает анализ изменений в аминокислотной и нуклеотидной последовательности и особый интерес в этой связи представляют изоферментные маркеры и ДНК-маркеры (в основном микросателлиты). Это связано с тем, что любые значимые изменения окружающей среды в процессе перемещения популяции оказывают влияние на аминокислотную последовательность молекулы фермента, а эволюционные процессы и естественный отбор направлены на сохранение особей с наиболее удачной комбинацией генов, более приспособленных к условиям обитания. Дуб черешчатый является лесообразующей породой древесных растений в европейской части Российской Федерации и относится к группе особо ценных древесных пород. Проблема сохранения и восстановления биоразнообразия дуба черешчатого в настоящее время стоит очень остро, поэтому изучение характера изменений в белковом спектре ферментов метаболических путей клетки и молекулярных

маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в условиях разных мест обитания, является актуальным.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа Н.А. Карпеченко изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных источников и приложения. Библиографический список включает 181 источник, из них 102 на русском языке. Экспериментальные данные проиллюстрированы 29 рисунками и 9 таблицами, а также 16 рисунками и 1 таблицей, представленными в Приложении.

Научная новизна работы. Автором впервые на примере дуба черешчатого, произрастающего в лесостепной зоне европейской части Российской Федерации, проведен анализ изменения биохимических и молекулярно-биологических параметров, который показал, что популяция дуба не является однородной структурой. Показано, что изменяющиеся условия окружающей среды приводят к преобразованиям белкового и генетического состава растительного организма адаптивного характера. Установлено, что в зависимости от условий произрастания дуба черешчатого формируются группы особей, которые имеют более схожий белковый спектр ферментов и молекулярных маркеров, что позволяет выделять различные экотипы внутри популяции.

Следует отметить и **практическую значимость** диссертационной работы. Полученные материалы могут быть использованы в лесоисследовательских лабораториях при изучении пространственной структуры насаждений дуба черешчатого для лесосеменного районирования, а также на лесохозяйственных предприятиях в европейской части Российской Федерации для создания лесосеменной базы дуба черешчатого в целях лесовосстановления и лесоразведения. Методические разработки автора по получению нуклеиновых кислот могут найти применение в учебном процессе при проведении практических занятий по биохимии и молекулярной биологии в образовательных учреждениях высшего профессионального образования.

Общая характеристика диссертации

Во «Введении» автор обосновывает актуальность избранной темы исследования, формулирует цель работы, основные задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

В главе 1 «Обзор литературы» (стр. 13-38) дана характеристика дуба черешчатого и приводится описание его биологического разнообразия, рассмотрены метаболические пути растительной клетки, такие как гликолиз, цикл Кребса, пентозофосфатный путь, шикиматный путь и ряд ферментов, участвующих в адаптивных процессах у растений. Проведен детальный анализ достоинств и недостатков биохимико-генетических маркеров, применяемых в исследованиях

древесных пород растений (морфологические, концентрация монотерпенов, общие, водорастворимые и запасные белки, изоферменты, ДНК-маркеры), который позволил автору выделить наиболее перспективные маркеры для решения прикладных и фундаментальных вопросов биохимии и генетики древесных растений – метод электрофоретического анализа изоферментов и использование ДНК-маркеров. Давая оценку проведенному анализу литературных источников, можно заключить, что диссертант отчетливо представляет состояние рассматриваемой проблемы и подводит к мысли о необходимости изучения белкового спектра ферментов метаболических путей клетки и молекулярных маркеров в популяции древесных растений дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), произрастающих в условиях разных мест обитания.

В главе 2 «Экспериментальная часть» (стр. 39-50) представлены такие разделы как «Цель и задачи исследования» и «Объекты и методы исследования». В разделе «Объекты и методы исследования» дана характеристика образцов дуба черешчатого, отобранных для анализа, и описание методов исследования. Знакомство с материалом этой главы позволяет однозначно констатировать, что использование современных и корректных методов исследования, хороший научно-методологический уровень и адекватная исследованию математическая обработка полученных результатов обеспечили получение диссертантом достоверного экспериментального материала.

В главе 3 «Результаты и их обсуждение» (стр. 51-93) подробно излагаются полученные экспериментальные данные, обсуждаются, обосновываются и формулируются промежуточные выводы.

В первом разделе «Изучение полиморфизма изоферментного состава в популяции дуба черешчатого» представлены результаты изоферментного анализа ферментов метаболических путей (алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, глюкозофосфатизомераза, шикиматдегидрогеназа, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза) деревьев дуба черешчатого из 14 климатипов. На основании анализа данных по полиморфизму белкового спектра изученных ферментов автор пришел к заключению, что из 8 исследованных ферментов для проведения популяционно-генетического анализа наиболее подходящими являются 6: алкогольдегидрогеназа, аланинаминопептидаза, изоцитратдегидрогеназа, фосфоглюкомутаза, лейцинаминопептидаза, флюоресцентная эстераза, поскольку они проявляют высокую вариабельность в своем белковом спектре.

Во втором разделе представлены результаты по определению характера изменений ДНК-маркеров в популяции дуба черешчатого различных мест произрастания. Следует отметить, что автор работал с недеградированными препаратами ДНК и использовал для ПЦР-анализа наиболее информативные при популяционном анализе дуба черешчатого RAPD-праймеры. Результаты ПЦР-

анализа инвертированных повторов ДНК по использованным четырем RAPD-праймерам выявили высокую вариабельность и информативность.

Далее автором была проведена работа по выявлению полиморфизма молекулярных маркеров у древесных растений дуба черешчатого колоновидной формы кроны различного происхождения (клонового или семенного). Значимыми результатами при анализе спектра ДНК-маркеров с использованием девяти RAPD-праймеров является обнаружение высокой вариабельности внутри каждой выборки и возможность использования Oligo 5 праймера в качестве индикатора колоновидной формы кроны в семенном потомстве дуба черешчатого с колоновидной формой кроны в экотипе г. Воронежа.

В четвертом разделе проведен анализ изменений биохимических показателей популяции дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации. Для этого материал образцов дуба черешчатого был проанализирован изоферментным методом и методом ДНК-анализа и определен уровень генетической изменчивости исследованных климатипов. Для более точной оценки уровня генетической изменчивости были рассчитаны основные параметры генетического полиморфизма (доля полиморфных локусов, число аллелей на локус, средняя ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность). Установлено, что в целом климатипы дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации характеризуются высоким уровнем генетической изменчивости.

В пятом разделе представлена структура популяции дуба черешчатого в лесостепи Российской Федерации. На основании расчета коэффициентов генетической дистанции Неи автором была установлена степень генетической дифференциации между всеми исследованными климатипами дуба черешчатого и построена дендрограмма, которая свидетельствует о наличии трех больших кластеров (экотипов) в исследованной выборке растений. Как оказалось, такое объединение исследованных климатипов в основном соответствует географическому расположению материнских насаждений. На основании полученных данных автором составлена карта границ популяционной структуры дуба черешчатого в лесостепи европейской части Российской Федерации.

В главе «Заключение» автор подводит итог проделанной работе и рассматривает возможность использования разработанных им позиций по отношению к другим древесным растениям.

Завершают работу выводы, которые соответствуют поставленным целям и задачам исследования, аргументированы и объективно отражают полученные экспериментальные данные.

К автору имеется ряд замечаний:

1. RAPD-анализ широко применяется в популяционном анализе и при идентификации генетических ресурсов, однако RAPD-праймеры зарекомендовали

себя как не совсем надёжные маркеры и точность оценок с помощью данного метода ниже по сравнению с методами, в которых используются кодоминантные маркеры (микросателлитные генетические маркеры). Следовало бы подкрепить полученные результаты анализом микросателлитных локусов, поскольку микросателлитные генетические маркеры обладают рядом положительных свойств, делающих их очень удобными и перспективными в исследованиях. Считает ли соискатель актуальным проведение подобного исследования в дальнейшем?

2. Список сокращений составлен не в алфавитном порядке, нет разграничения на русскоязычные и англоязычные сокращения. Это затрудняет восприятие текста. Некоторые из сокращений в тексте диссертации не упоминаются, например ЭТЦ и UCP, более того, для UCP приведено неправильное англоязычное название.

3. В «Обзоре литературы» автор использовал схемы гликолиза (рис. 1, стр. 21) и цикла Кребса (рис. 2, стр. 22). Считаем излишним использование в диссертации общеизвестных метаболических путей клетки, тем более ссылки на источник происхождения этих схем не указаны.

4. В главе «Результаты и их обсуждение» на рис. 20 - 23, 25, 26 (стр. 72 - 75, 79, 80) приведены электрофореграммы ПЦР-продуктов. К сожалению, в легендах к самим рисункам не указана длина фрагментов ДНК, входящих в состав маркеров. Это существенно затрудняет восприятие текста. Кроме того подпись к рисункам «Электрофореграмма ПЦР деревьев дуба черешчатого...» стилистически составлена неверно, поскольку на фореграммах представлены продукты ПЦР реакции, к тому же конкретных образцов деревьев (почки или ткани побегов).

5. В Приложении 1 «Рецептура приготовления окрашивающих растворов и методика окрашивания гелевых срезов» автор приводит протоколы приготовления растворов для окрашивания ферментов в геле. Оформление этих протоколов не соответствует общепринятым методическим критериям приготовления растворов. Для точного воспроизведения протокола независимым исследователям необходимо знать точные концентрации соединений, входящих в состав раствора. Советуем автору в будущем в научных работах излагать методические процедуры профессионально правильно.

6. Несмотря на хороший стиль изложения и грамотность в тексте имеется ряд недостатков: нет отступов между предложениями (стр. 13, 18, 23) и словами (стр. 19, 39, 71, 94), единицы концентрации растворов указаны как в русской, так и в английской транскрипции.

7. В диссертационной работе приведен список литературных источников, включающий 181 работу. При анализе оказалось, что на целый ряд работ, который приведен в списке, нет ссылок в тексте, и таких ссылок – 45. Кроме того, при описании основных метаболических путей клетки и ферментов, участвующих в них (гликолиз, цикл Кребса, алкогольдегидрогеназа,

аланинаминопептидаза, фосфоглюкомутаза), автору следовало бы сослаться на классические работы по биохимии (например, «Основы биохимии» А. Ленинджера), а не на такой источник как Wikipedia (ссылка 176).

Однако в целом, несмотря на высказанные замечания, считаем, что соискателем выполнено современное законченное научное исследование, которое хорошо аргументировано, результаты содержат новую для науки информацию. Фактический материал хорошо иллюстрирован рисунками и таблицами. Результаты исследований прошли апробацию на отечественных и международных конференциях, при этом три работы были отмечены почетными грамотами и дипломом как лучшие. Основные результаты диссертации изложены в 7 публикациях, из них 3 – в научных изданиях, включенных в Перечень ВАК. Кроме того, разработаны проекты «Рекомендации по сохранению генофонда дуба черешчатого и его регионального использования в лесостепи европейской части Российской Федерации» и «Методики изоферментного анализа и молекулярных маркеров для определения пространственной структуры насаждений дуба черешчатого».

Анализ представленного диссертантом материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показаны вклад автора в проведенное исследование, степень новизны и практическая значимость результатов исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Карпеченко Никиты Александровича «Анализ белковых спектров ферментов метаболических путей и инвертированных повторов ДНК древесных растений дуба черешчатого, произрастающих в лесостепи европейской части Российской Федерации» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена задача по поиску биохимических маркеров и молекулярных маркеров ДНК в популяции древесных растений, что обуславливает значимость полученных данных для развития биологии. Работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденному постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Соискатель Карпеченко Никита Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Работа обсуждалась на заседании лаборатории физиологической генетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского
института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской
академии наук (протокол №2 от 17 июня 2014 г.).

Главный научный сотрудник
лаборатории физиологической генетики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Сибирского института физиологии
и биохимии растений Сибирского отделения
Российской академии наук (СИФИБР СО РАН),
доктор биологических наук, доцент
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132,
раб. тел.: (3952) 42-46-59, email: pobezhimova@sifibr.irk.ru

 Побежимова Тамара Павловна

Подпись Т. П. Побежимовой заверяю: 
Ученый секретарь СИФИБР СО РАН Г. В. Копытина

«19» июня 2014 г.

