

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.047.01  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ СИБИРСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ И  
БИОХИМИИ РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ  
СТЕПЕНИ КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК.**

аттестационное дело № \_\_\_\_\_  
решение диссертационного совета от 17 июня 2015 г. № 4

О присуждении **Боровик Ольге Андреевне** (Российская Федерация) ученой степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Функционирование альтернативной оксидазы и НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ II типа в митохондриях из этиолированных и зеленых побегов озимой пшеницы при холодовом закаливании» **по специальности** 03.01.05 – «физиология и биохимия растений» принята к защите 6 апреля 2015 г., протокол №2 диссертационным советом Д. 003.047.01. на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132, а/я 317), приказ о создании №105/нк от 11 апреля 2012 г.

**Соискатель** Боровик Ольга Андреевна, 1989 года рождения, работает ведущим инженером в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

**Диссертация выполнена** в лаборатории физиологической генетики растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН.

В 2011 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Иркутский государственный университет».

В 2014 году Боровик Ольга Андреевна окончила аспирантуру с предоставлением рукописи.

**Научный руководитель** – Грабельных Ольга Ивановна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологической генетики растений.

**Официальные оппоненты:**

1. Илли Иван Экидиусович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Иркутский государственный аграрный университет имени А.А. Ежевского (бывшее Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Иркутская государственная сельскохозяйственная академия), профессор кафедры агроэкологии, агрохимии, физиологии и защиты растений.

2. Таланова Вера Викторовна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение науки Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений.

**дали положительные отзывы о диссертации.**

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук в своем **положительном заключении**, подписанном Шугаевым Александром Григорьевичем, доктором биологических наук, заведующим лабораторией дыхания растений и механизмов его регуляции, указала, что полученные в работе результаты подтверждают ключевую роль митохондрий и, в целом, энергетического обмена клетки в реализации программы адаптации озимой пшеницы к низкотемпературному стрессу. Работа представляет собой большое и серьезное исследование, отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Боровик Ольга Андреевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Соискатель имеет **34 опубликованных работы**, в том числе **по теме диссертации 17 работ** объемом 5,45 печатных листов, опубликованных в **рецензируемых научных изданиях – 7 работ.**

**Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:**

1. Антиоксидантная функция альтернативной оксидазы в митохондриях озимой пшеницы при холодовом закаливании / О.И. Грабельных, Т.П. Побежимова, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, О.А. Боровик, И.В. Любушкина, В.К. Войников // Биологические мембраны. – 2011. – Т. 28, № 4. – С.274–283.

2. Боровик О.А. Альтернативные ферменты дыхательной цепи митохондрий принимают участие в развитии морозоустойчивости озимой пшеницы / О.А. Боровик // В мире научных открытий. – 2014. – № 8(56). – С. 7–21.

3. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозоустойчивости проростков озимой пшеницы / О.И. Грабельных, О.А. Боровик, Е.Л. Таусон, Т.П. Побежимова, А.И. Катышев, Н.С. Павловская, Н.А. Королева, И.В. Любушкина, В.Ю. Башмаков, В.Н. Попов, Г.Б. Боровский, В.К. Войников // Биохимия. – 2014. – Т. 79, вып. 6. – С. 647–662.

4. Влияние углеводного статуса и низкой температуры на дыхательный метаболизм митохондрий из этиолированных листьев озимой пшеницы / О.А. Боровик, О.И. Грабельных, Н.А. Королева, Т.П. Побежимова, В.К. Войников // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 118–130.

**На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

ведущей организации ИФР РАН, г. Москва, 6 замечаний: 1. Судя по описанию методики ингибиторного анализа в автореферате (стр.7), и диссертации (стр. 62-63), а также подписи к рис.15 в диссертации (стр. 76), в работе было изучено действие гипотермии в основном на потенциальную активность АО (или альтернативного пути – АП) в митохондриях проростков и зеленых листьев озимой пшеницы, выявляемую по ее чувствительности к БГК в присутствии цианида – ингибитора цитохромного пути окисления митохондрий. Это важный показатель, характеризующий потенциальную (или максимальную) активность АО (или  $V_{alt}$ ). Однако, как справедливо отмечает в диссертации сам автор, эта активность не всегда точно отражает реальный вклад или вовлеченность АО в дыхание митохондрий (или  $v_{alt}$ ), что, конечно, следует учитывать в трактовке полученных в работе результатов. Вообще, судя по приведенной в диссертации табл. 2, наиболее яркие и существенные для понимания ситуации данные, свидетельствующие о влиянии холодового закаливания на вклад АО в дыхание митохондрий озимой пшеницы, были получены именно в тех опытах, где была определена ее реальная вовлеченность в дыхание. Возникает вопрос, почему определение этой активности АО не было проведено в большинстве проведенных экспериментов? 2. В этой связи следует также отметить, что некоторые полученные данные не согласуются с утверждением автора (см. вывод 1) о причастности АО к повышению морозоустойчивости побегов озимой пшеницы, поскольку при закаливании в темноте и на свету содержание белка АО в зеленых и этиолированных листьях изменялось незначительно (автореферат рис. 7д и рис. 8г), а цианид-резистентное дыхание тормозилось (там же рис. 7а,б и рис. 8а,б,в); 3. Далее, похвальное в целом желание автора сделать обобщающие выводы на основании результатов, полученных на митохондриях, выделенных из растений разного возраста, разных тканей и подвергнутых различным воздействиям, не всегда корректны. В частности, сахароза индуцирует синтез низкомолекулярных дегидринов только в листьях этиолированных побегов озимой пшеницы (автореферат рис. 4в, и рис. 6а), а не во всех вариантах эксперимента (см. вывод 2). Кроме того, содержащееся в выводе 4 утверждение о том, что «цианид-резистентное дыхание участвует в поддержании функциональной активности митохондрий озимой пшеницы при низкой температуре независимо от типа ткани (фото- или гетеротрофная)» противоречит данным, свидетельствующим, что низкая температура ингибирует этот путь окисления в митохондриях зеленых листьев побегов (автореферат, рис. 8 а,б,в); 4. В формулировке вывода 3, в котором совершенно справедливо отмечено наличие взаимосвязи между уровнем сахаров в побегах и листьях пшеницы и активностью альтернативных путей митохондриального окисления, вместе с тем несколько смещены акценты. На наш взгляд, не только и, может быть, не столько содержание водорастворимых углеводов определяет функционирование и активность АО и других альтернативных путей митохондриального окисления, сколько, наоборот, благодаря их активации при стрессе поддерживаются процессы дыхания и фотосинтеза, обеспечивающие образование и накопление углеводов; 5. Кроме того, судя

по представленным данным (автореферат рис. 1б. и рис. 2а), влияние водорастворимых углеводов на интенсивность дыхания митохондрий этиолированных проростков не столь однозначно, как заявлено в выводе 3, т.е. «содержание водорастворимых углеводов в тканях озимой пшеницы определяет интенсивность дыхания митохондрий»; 6. В заключение небольшое замечание по поводу списка цитируемой литературы. В его оформлении отсутствует единообразие, часть ссылок оформлена традиционно, т.е. сначала указаны авторы, далее название статьи и журнала. Однако другая часть ссылок почему-то начинается сразу с названия цитируемой работы, а потом указаны ее авторы;

официального оппонента д.б.н., проф. И.Э. Илли, Иркутский ГАУ, г. Иркутск, 2 замечания: 1. На странице 54 и далее по тексту указано, что для обогащения сахарами экспериментальных растений использовали раствор 12%-ой сахарозы. Но ведь сахароза не метаболит, а транспортная форма растворимых углеводов для перемещения их по флоэме. По-видимому, следовало бы дать обоснование этому выбору; 2. На странице 53 и далее по тексту указано, что для получения зеленых растений их освещали непрерывно либо 16 ч, либо 24 ч. Этот прием автором работы назван фотопериодом. По нашему мнению это не фотопериод, а всего лишь продолжительность освещения растений, что вполне правомочно в данном эксперименте. Фотопериод участвует в регуляции цветения растений;

официального оппонента д.б.н. В.В. Талановой, ИБ КарНЦ РАН, г. Петрозаводск, 5 замечаний: 1. На мой взгляд, не совсем удачно название раздела «Разветвленная дыхательная цепь митохондрий как механизм повышения адаптивного потенциала клеток растений»; 2. В единице измерения освещенности сделана ошибка: вместо  $\text{мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с}^{-1})$  следует писать  $\text{мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$ ; 3. Не обоснована в тексте необходимость использования в исследованиях не только 7-ми суточных этиолированных растений, но и 3-х суточных этиолированных проростков, поскольку нет принципиальной разницы в их реакции на низкую температуру; 4. Глава 4 «Обсуждение» слишком растянута. Кроме того, в ней было бы целесообразно привести обобщающую таблицу или схему для облегчения восприятия представленного материала; 5. Отсутствует заключение, в котором в кратком виде принято суммировать выявленные в ходе выполнения диссертационной работы закономерности;

д.б.н., проф. Т.К. Головки, ИБ Коми УрО РАН, г. Сыктывкар, 1 пожелание: в качестве пожелания, хотелось бы видеть в заключительной части обсуждения общую схему, отражающую причинно-следственные связи и роль дыхательных путей в метаболизме гетеротрофных и фототрофных клеток растений при холодовом закаливании; к.х.н. В.Е. Софроновой, ИБПК СО РАН, г. Якутск, 3 замечания: 1. Кажется не совсем удачным выражение «снижение фотоингибирования в зеленых листьях при избыточном освещении» (стр. 15, строка 15 сверху); 2. В опытах применяли освещение интенсивностью 200-250  $\text{мкмоль}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$  ФАР, что является умеренным в контрольных условиях, и, повышенным при 2-5 °С. Поэтому лучше было бы заменить слово «избыточном» на «непрерывном». О снижении

фотоингибирования автор судит только по накоплению сахаров, адекватным дополнением было бы определение фотохимической активности ФС II; 3. Для лучшего восприятия материала читателям, в конце автореферата желательным было бы привести обобщающую схему путей транспорта электронов, отражающую сходства и различия в функционировании ротенон-нечувствительных НАД(Ф)Н-ДГ и АО в фотоавто-и гетеротрофных тканях растений озимой пшеницы на свету и в темноте в присутствии экзогенной сахарозы и без нее в контроле и в условиях закаливания; к.б.н. Е.В. Гармаш, ИБ Коми УрО РАН, г. Сыктывкар, 2 замечания: 1. При обсуждении сахарозависимой регуляции АО и альтернативных НАД(Ф)Н-ДГ было бы логично привести математически обработанные корреляции между этими параметрами, которые могли бы наглядно свидетельствовать о существовании данной связи; 2. То же самое касается и вопроса об антиоксидантной роли АО; корреляция между данными, показывающими активацию АО и содержание АФК, могла бы подкрепить вывод, а может и внести уточняющие сведения; д.б.н. Ф.В. Минибаевой и к.б.н. С.А. Дмитриевой, Казанский институт биохимии и биофизики, г. Казань, 4 стилистических замечания: 1. Излишняя глобализация формулировки задачи номер 5, поскольку очевидно, что механизмы регуляции включают в себя намного более разнообразные аспекты, чем те, которые изучались в настоящей работе; 2. В разделе методы непонятна формулировка «содержание хлорофилла в митохондриях»; 3. Некорректная формулировка третьего положения, выносимого на защиту; 4. В тексте использованы жаргонные выражения, например, «растения, закаленные на сахарозе»; к.б.н. А.Р. Лубяновой и д.б.н., профессора Ф.М. Шакировой, Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра, г. Казань, замечаний нет; д.б.н. И.В. Жигачевой, ИБХФ РАН, г. Москва, замечаний нет; д.б.н. Е.К. Хлесткиной, ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, замечаний нет; д.б.н., проф. В.С. Кравца, Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, г. Киев, замечаний нет; д.б.н., проф. А.Н. Ершовой, ВГПУ, г. Воронеж, замечаний нет; д.б.н., проф. В.Н. Хрянина, Пензенский государственный университет, г. Пенза, замечаний нет; к.б.н. Г.В. Новицкой, ИФР РАН, г. Москва, замечаний нет; д.б.н., проф. Е.В. Алаудиновой, СибГТУ, г. Красноярск, замечаний нет; д.б.н., доц. О.А. Тимофеевой, КФУ, г. Казань, замечаний нет; д.б.н. К.А. Петрова, ИБПК СО РАН, г. Якутск, замечаний нет.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью своими достижениями в данной отрасли науки по специальности защищаемой диссертации. В ведущей организации – ИФР РАН работают специалисты, занимающиеся изучением дыхания растений и механизмов его регуляции, а также вопросами формирования механизмов холодо- и морозоустойчивости. Официальные оппоненты д.б.н., проф. И.Э. Илли является специалистом в области возделывания мягкой пшеницы и изучения ее адаптационных характеристик в условиях Сибири, а д.б.н. В.В. Таланова занимается изучением вопросов устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды и механизмов низкотемпературного закаливания пшеницы.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработаны** положения, вносящие значительный вклад в понимание механизмов устойчивости растений к действию низких температур и расширяющие современные представления о механизмах функционирования и регуляции нефосфорилирующих путей транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий фотоавто- и гетеротрофных растительных клеток при адаптации растений к низким температурам;

**предложена** оригинальная научная гипотеза, согласно которой митохондрии и их энергорассеивающие системы участвуют в развитии морозоустойчивости растений и защите их фотосинтетического аппарата при низкотемпературном стрессе;

**доказана** зависимость функционирования альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ в митохондриях озимой пшеницы от углеводного статуса; доказана способность экзогенной сахарозы индуцировать синтез ряда низкомолекулярных дегидринов в листьях озимой пшеницы.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

**доказано** участие альтернативной оксидазы и «внешней» НАД·Н-дегидрогеназы в повышении морозоустойчивости растений и возможность выполнения альтернативной оксидазой антиоксидантной функции;

**применительно к проблематике диссертации результативно (эффективно, то есть с получением обладающих новизной результатов)** использован комплекс современных подходов, включающий полярографический, спектрофотометрические, электрофоретические и иммунологические методы анализа;

**изложены** данные, указывающие на взаимосвязь содержания сахаров, синтеза дегидринов, активности альтернативной оксидазы и «внешней» НАД·Н-дегидрогеназы и морозоустойчивости растений; данные о важной роли света в регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ;

**раскрыты** общие механизмы и особенности формирования морозоустойчивости этиолированных и зеленых растений озимой пшеницы; раскрыта роль света и водорастворимых углеводов в регуляции активности альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ в митохондриях из листьев озимой пшеницы при действии низкой температуры;

**изучена** связь между содержанием сахаров, активностью альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ и морозоустойчивостью озимой пшеницы; изучено влияние светового режима

выращивания и низкотемпературного закаливания растений на функционирование АО и НАД(Ф)·Н-ДГ II типа в митохондриях из листьев озимой пшеницы;

**проведена модернизация** существующих представлений об активности, роли и возможных механизмах регуляции альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)·Н-дегидрогеназ в митохондриях из фотоавто- и гетеротрофных тканей растений при низких температурах.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**определены** энергорассеивающие системы митохондрий, функционирование которых играет важную роль при адаптации растений к холоду и морозу;

**созданы** предпосылки для разработки подходов, направленных на повышение холодо- и морозоустойчивости растений озимой пшеницы;

**представлены** данные, которые могут быть использованы для чтения лекций по физиологии и биохимии растений, а также оригинальные экспериментальные подходы, которые могут быть использованы в ведущих научно-исследовательских учреждениях РАН, занимающихся изучением вопросов биоэнергетики и холодо- и морозоустойчивости сельскохозяйственных культур.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила**

**для экспериментальных работ** результаты получены с применением оборудования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН и оборудования ЦКП Фитотрон СИФИБР СО РАН с использованием стандартных и апробированных методик. Показана воспроизводимость результатов в различных экспериментах. Объем проведенных исследований достаточен для получения достоверных выводов. Значимость установленных в работе различий подтверждена статистической обработкой данных. Статистическая обработка выполнена на базе программного обеспечения Microsoft Office Excel и SigmaPlot 12.5;

**теория** основана на представленных в литературе данных о роли альтернативных ферментов дыхания в защите митохондрий при низкотемпературном воздействии и данных о роли альтернативных ферментов дыхания в защите ЭТЦ хлоропластов от фотоингибирования при избыточном освещении;

**идея** базируется на сведениях о роли митохондрий и митохондриальных энергорассеивающих систем в механизмах адаптации растений к стрессовым факторам;

**использовано** сравнение результатов, полученных автором, с данными литературы, посвященными исследованию роли и механизмов регуляции

активности альтернативной оксидазы митохондрий и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ в различных условиях (в том числе при низкотемпературном стрессе) у разных видов растений с гетеротрофным и фотоавтотрофным типом питания;

**установлено**, что полученные результаты касательно функционирования альтернативной оксидазы и ротенон-нечувствительных НАД(Ф)-Н-дегидрогеназ не противоречат данным, представленным в независимых источниках по данной тематике, что может служить доказательством важной роли этих ферментов в механизмах низкотемпературной адаптации растений; **использованы** современные методики сбора и обработки электронной информации, такие как PubMed (<http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/>), Google Академия (<http://scholar.google.ru/>), Microsoft Academic search (<http://academic.research.microsoft.com/>), Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU (<http://elibrary.ru/>). Систематизация полученной информации проводилась с использованием компьютерной техники.

**Личный вклад соискателя состоит в:** планировании и проведении экспериментов, в статистической обработке и интерпретации полученных результатов, в написании статей, опубликованных по результатам работы, а также в апробации результатов исследования в ходе выступления на конференциях различного уровня.

На заседании 17 июня 2015 г. диссертационный совет принял решение присудить Боровик Ольге Андреевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук, участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за – 13, против – 1, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель заседания  
диссертационного совета Д 003.047.01,  
чл. корр. РАН

 Саляев Рюрик Константинович

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 003.047.01,  
кандидат биологических наук

 Акимова Галина Петровна

17 июня 2015 г.

