

УТВЕРЖДАЮ
проректор по научной работе
Санкт-Петербургского государственного
университета

С.П.Туник
02 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущего учреждения

о диссертации Авраменко Татьяны Викторовны
**«Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах
растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC*»,**
представленной к защите на соискание ученой степени кандидата
биологических наук
по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность работы

Способность агробактерий трансформировать растительные клетки известна уже несколько десятилетий. Это свойство лежит в основе получения коммерческих линий трансгенных растений, а также является важным инструментом фундаментальных исследований в области генетики развития растений, молекулярной биотехнологии и т. д.

Хотя явление агробактериальной трансформации растений активно изучается в течение порядка 40 лет, многие моменты до сих пор остаются неизвестными. Это относится, например, к функциям генов Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes*. Долгое время их обсуждали с точки зрения влияния на количество активных форм фитогормонов и изменения чувствительности к ним. В последние годы возникли идеи относительно роли *rol*-генов в регуляции уровня вторичных метаболитов, что нашло воплощение в получении клеточных линий — продуцентов веществ вторичного метаболизма для нужд фармацевтической промышленности. Появились данные о том, что *rol* гены оказывают значительное влияние на защитный аппарат растительных клеток - характеризуются устойчивостью к стрессовым воздействиям и пониженным уровнем внутриклеточных активных форм кислорода. В связи с этим особый интерес вызывают ферментные системы,

участвующие в метаболизме активных форм кислорода (АФК), чему и посвящена представленная работа.

Характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Т.В. Авраменко написана по традиционному плану и состоит из разделов: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список используемых сокращений, список литературы. Хотелось бы, однако отметить, что формулировка «Литературный обзор» является не очень удачной. Корректнее данный раздел обозначить, как «Обзор литературы».

В обзоре литературы автор рассматривает вопросы связанные с функционированием *rol* генов агробактерий, делая упор на их влияние на защитные механизмы клетки, далее подробно характеризует структуру и функции пероксидаз III класса, их применение. Данный раздел создает благоприятное впечатление четкостью и логичностью изложения материала.

Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам, они разнообразны и включают культивирование тканей растений *in vitro*, молекулярно-генетические, биохимические и статистические методы. Результаты описаны подробно, логично. Цели последующих экспериментов вытекают из результатов предыдущих.

Список литературы включает 290 источников, из которых 16 — на русском языке. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

Новизна исследования и наиболее существенные результаты

В представленной диссертационной работе впервые изучено регуляторное действие агробактериальных генов *rol* в отношении растительных пероксидаз III класса, в трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia*. Показано, что активация пероксидаз III класса происходит при сверхэкспрессии гена *rolB*. Данный эффект не характерен для *rolC*. Совместная экспрессия генов *rolB* и *rolC* в составе дикого штамма pRiA4 также не оказывает значительного

эффекта на пероксидазы III класса, что указывает на антагонистичное действие гена *rolC* в отношении *rolB*. Проведено исследование молекулярных механизмов *rolB*-индуцируемой активации пероксидаз III класса и показано отсутствие взаимосвязи с общим изменением уровня внутриклеточных АФК на фоне трансформации. Установлено, что *rolB*-индуцируемая активация пероксидаз III класса вызывает транскрипционную и ферментативную активацию белков пероксидаз. Показано, что данный эффект сохраняется на всех фазах роста в течение пассажа. Установлено, что *rolB* является более сильным индуктором пероксидаз III класса по сравнению с другими абиотическими стрессами, включая низкую и высокую температуры, обработку NaCl и метилжасмонатом. Получены данные о способности гена *rolB* активировать пероксидазы в трансгенных клеточных культурах других растений, в частности, *Silene vulgaris*, *Rhodiola rosea*, что свидетельствует об универсальности выявленных в работе механизмов работы гена *rolB*.

Значимость результатов, полученных в работе

Полученные результаты вносят вклад в понимание регуляторного действия генов *rolB* и *rolC* из *A. rhizogenes* на защитный аппарат растительной клетки и дополняют имеющиеся сведения о молекулярных механизмах взаимодействия растений и бактериальных патогенов. В контексте практического применения возможно использование генов *rol* для создания клеточных культур растений – суперпродуцентов пероксидаз III класса с целью биотехнологического производства ферментов. Полученные сведения о роли индивидуальных изоформ пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса могут служить основой для создания трансгенных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям.

Замечания к диссертационной работе

К сожалению, к диссертационной работе имеется ряд замечаний:

1. В обзоре литературы на с 14 автор утверждает, что функция RolB связана с

его тирозинфосфатазной активностью. Это не совсем так. Действительно RolB из pRi A4 - связанный с мембраной белок, в то время как его гомолог из pRi1724 обладает ядерной локализацией и не имеет фосфатазной активности (Moriuchi et al. 2004).

2. По мнению рецензента в разделе, посвященном структуре и функциям пероксидаз - не хватает иллюстраций. Они бы облегчили понимание преподносимой информации.

3. После прочтения раздела «Методы» остается не понятным, из каких органов получены трансгенные ткани. Изучали ли изменчивость в тканях различного происхождения? Вместе с тем указано, что нетрансформированные культуры *Rh. rosea* и *S. vulgaris* получены из соцветия взрослых растений (Bulgakov et al., 2010), а нетрансформированная (контрольная) каллусная культура марены (R) была получена из листьев проростков растения (Bulgakov et al., 2002). Насколько корректно сравнивать ткани различного происхождения?

4. При оценке динамики экспрессии генов пероксидаз III класса автор утверждает, что в *rolB*-трансгенной культуре пик экспрессии генов пероксидаз наблюдали на 15-ый день, в отличие от контрольной линии, где пик отмечен на 20 день. А оценивали ли какие либо еще показатели (например, скорость накопления биомассы)?

5. В работе имеются неудачные формулировки, жаргонизмы, опечатки.

В работе есть Оглавление, но нет глав. Если нет глав, правильное использовать термин «Содержание».

Нумерация подразделов выглядит странно 1.2; 1.4; 1.3, снова 1.4, далее 1.6

О названии раздела «Литературный обзор» было сказано выше.

На странице 24 неверно использовано русскоязычное название *Lactuca sativa*. Это салат латук, а не капуста.

В тексте на странице 20 несколько раз упоминается химическое соединение под названием «перекись». Корректнее в научном тексте было бы писать «перекись водорода».

Неоднократно встречается выражение «степень гомологии», а речь идет о степени сходства нуклеотидных или аминокислотных последовательностей.

Рекомендации к использованию результатов диссертационной работы

Полученные автором результаты могут быть использованы в курсах лекций по биотехнологии на биологических факультетах высших учебных заведений, кроме того ген *rolB* может быть использован для создания клеточных культур растений – суперпродуцентов пероксидаз III класса с целью биотехнологического производства ферментов. Полученные сведения о роли индивидуальных изоформ пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса могут служить основой для создания трансгенных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям.

Автореферат Т.В. Авраменко соответствует основным положениям диссертации и адекватно отражает ее содержание. По теме диссертации опубликованы 3 статьи в реферируемых журналах. Результаты, полученные в работе, были представлены на международных конференциях.

Заключение

Диссертационная работа Авраменко Татьяны Викторовны «**Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC***», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология) — является законченным научным исследованием, посвященным изучению влияния *rol* генов Т-ДНК агробактерий на экспрессию генов и активность **пероксидаз III класса в клеточных линиях *Rubia cordifolia*, *Silene vulgaris*, *Rhodiola rosea***, соответствующей критериям, установленным п.7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации №74 от 30.01.2002г. (в редакции

постановления Правительства Российской Федерации от 20 июня 2011 г. № 475). По актуальности выбранной темы и новизне полученных результатов, их значению для дальнейших исследований диссертационная работа удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Т.В. Авраменко, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Отзыв заслушан и утвержден на заседании кафедры генетики и биотехнологии протокол №10 от 15 февраля 2016 г.

Отзыв составлен профессором кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета



д.б.н. Татьяна Валерьевна Матвеева

Сведения о составителе отзыва:

Матвеева Татьяна Валерьевна — доктор биологических наук по специальности 03.02.07 — генетика, профессор кафедры генетики и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного университета, звание — доцент,

199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, т (812)3281590, radishlet@gmail.com



Подпись *Т.В. Матвеевой*
ЗАВЕРЯЮ
15.02.2016

Исполнитель: И.К. Корольская
Управление кад-

Сведения о ведущей организации

по кандидатской диссертации Т.В. Авраменко «Активность и продукция пероксидаз
III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и
rolC», по специальности 03.01.06 – «биотехнология (в том числе
бионанотехнологии)»

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербургский университет или СПбГУ
Ведомственная принадлежность	Правительство Российской Федерации
Почтовый индекс, адрес организации	199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д.7/9
Адрес официального сайта в сети «Интернет»	www.spbu.ru
Телефон	+7 (812) 328-97-01
Адрес электронной почты	spbu@spbu.ru
Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет	<p>1. Matveeva TV, Sokornova SV, Lutova LA Influence of Agrobacterium oncogenes on secondary metabolism of plants // <i>Phytochemistry Reviews</i>, 2015. — Vol. 14, — № 3. — P. 541-554</p> <p>2. Владимиров И. А., Матвеева Т.В., Лутова Л. А. Гены биосинтеза и катаболизма опинов <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и <i>Agrobacterium rhizogenes</i> // <i>ГЕНЕТИКА</i>, 2015. — Vol. 51, — № 2. — P. 137-146</p> <p>3. Сокорнова С.В., Гасич Е.Л., Матвеева Т.В., Афонин А.Н. Микромицеты растений <i>Linaria</i>, содержащих в геноме Т-ДНК // <i>МИКОЛОГИЯ И ФИТОПАТОЛОГИЯ</i>, 2015. — Vol. 49, — № 3. — P. 188-193</p>

4. Матвеева Т.В. Природно-трансгенные растения, как модель для изучения отсроченных экологических рисков возделывания ГМО // ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА, 2015. — Т. XIII (2), — С. 118-123
5. Pavlova, O.A., Matveeva, T.V., Lutova, L.A. Genome of *Linaria dalmatica* Contains *Agrobacterium rhizogenes* RolC Gene Homolog // Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014. — Vol. 4, — № 5. — P. 461-465
6. Владимиров И.А., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. ПЦР в реальном времени для изучения распространения агробактерий. — СПб: ГАЛАНИКА, 2014. — 68 с.
7. Pavlova O.A., Matveeva T.V., Lutova L.A. Genome of *Linaria dalmatica* Contains *Agrobacterium rhizogenes* RolC gene homolog // Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014. — Vol. 4, — № 5. — P. 461-465
8. Matveeva T. V. *, Lutova L. A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants // FRONTIERS IN PLANT SCIENCE, 2014. — Vol. 5, — 00326
9. O. A. Kulaeva, T. V. Matveyeva, L. A. Lutova Investigation of a possible horizontal gene transfer from agrobacteria to some representatives of the Solanaceae family // Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014. — Vol. 4, — № 5. — P. 455-460
10. O. A. Pavlova, T. V. Matveyeva, L. A. Lutova rol-Genes of *Agrobacterium rhizogenes* // Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2014. — Vol. 4, — № 2. — P. 137-145
11. Matveeva T., Bogomaz D., Pavlova O., Nester E., Lutova L. Horizontal Gene Transfer from Genus *Agrobacterium* to the Plant *Linaria* in Nature // Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012. — Vol. 25, — № 12. — P. 1542-1551
12. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И. Лутова Л.А. Малый практикум по генной инженерии.. — Санкт-Петербург: Реноме, 2011.
13. Матвеева Т. В., Павлова О. А., Богомаз Д. И., Демкович Е. А., Лутова Л. А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики

	растений // ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ГЕНЕТИКА, 2011. — Т. IX, — № 1. — С. 32-43
--	---

Верно

Директор Центра экспертиз



Л.А. Цветкова

