

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
<http://www.bionet.nsc.ru>
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

от 12.02.2022 № 0345-29-26/22
на № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Института
член-корр. РАН
А.В.Кочетов
« 31 » января 2022 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Огневой Златы Владимировны «Влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стрессам», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Златы Владимировны Огневой посвящена исследованию механизмов формирования устойчивости растений на воздействие внешних неблагоприятных факторов окружающей среды, а именно, изучению молекулярных механизмов, связанных с дифференциальной экспрессией защитных генов, обеспечивающих активацию биосинтеза вторичных метаболитов. Основное внимание диссертанта по данной проблеме сосредоточено на выявлении молекулярно-биологических путей регулирования биосинтеза стильбенов, как наиболее слабо исследованного на данный момент времени звена в реализации растением защитных механизмов на внешние неблагоприятные воздействия с привлечением вторичных метаболитов полифенольной природы. Накопленные к настоящему времени огромные базы данных о составе нуклеотидных последовательностей генов у разных видов растений, в том числе и генов устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам окружающей среды, а также разработка методов целенаправленного воздействия на выбранные исследователем целевые гены с применением генно-инженерных подходов в биологии, открывают перед исследователями новое направление, связанное с инженерной биологией

стресс-толерантности растений. В связи с тем, что пути регулирования биосинтеза стилибенов изучены слабо, диссертантом поставлена перед собой достаточно амбициозная цель, направленная на выявление различного класса стилибенов и соответствующих ферментов их биосинтетического пути в реализации ответных реакций на абиотические стрессы, а также на создание альтернативных источников стилибенов. В связи с неблагоприятными изменениями условий произрастания важных сельскохозяйственных культур, а также глобальными изменениями климата, проблема изучения молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений на неблагоприятные факторы среды является чрезвычайно важной. Именно это подчеркивает значимость и актуальность выбранной для диссертационной работы темы, связанной с изучением сверхэкспрессии генов стилибен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стрессам. Выявленные закономерности биосинтеза стилибенов и их вклад в защиту растения от стрессовых воздействий могут быть успешно использованы в дальнейшем в биотехнологии и генетической инженерии растений. Исследования в данном направлении имеют не только фундаментальное, но и оригинальное прикладное значение, поскольку открывают перспективы создания высокоэффективных путей защиты растений от негативного влияния абиотических факторов. В связи с выше изложенным, актуальность данного направления исследований диссертанта не вызывает сомнения как в теоретическом, так и практическом плане.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 111 страницах и содержит 16 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 232 источника.

Во Введении диссертантом обоснованы актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулирована цель исследования и поставлены задачи для ее достижения. На основании представленных в этом разделе материалов, цель диссертационной работы, направленная на анализ участия стилибенов в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам и создание альтернативных источников стилибенов, вполне обоснована и достижима.

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературы и включает современные данные об абиотических стрессах, которым подвергаются растения в течение своего жизненного цикла, а также на анализ современных достижений мирового сообщества в исследовании ответных защитных реакций растения на различные типы абиотических воздействий. Рассмотрены молекулярные механизмы формирования растением защитных ответов на воздействие повышенных и пониженных температур, защитных ответов на засуху и высокое содержание солей, а также влияние различных диапазонов ультрафиолетового облучения. В целом, обзор литературы касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе диссертантом детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал современных методов, применяемых в мировой практике молекулярного клонирования, анализа экспрессии генов, культуры клеток растений, биохимических исследований. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований. Особенно хотелось бы подчеркнуть корректное использование генетически модифицированных растений для дальнейшего количественного анализа спектра стилибенов – отбор гомозиготных форм в течение нескольких поколений

самоопыления.

Аналитическое рассмотрение двух глав (Глава 3 "РЕЗУЛЬТАТЫ" и Глава 4 «ОБСУЖДЕНИЕ») позволяет заключить следующее: автором была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе проведения исследования задачи. Полученные в диссертационной работе экспериментальные данные расширяют имеющиеся представления о механизмах реализации растением защитных реакций на внешние неблагоприятные воздействия с привлечением вторичных метаболитов полифенольной природы, в частности стильбенов.

С использованием обработки растений кумаровой и кофейной кислотами диссертантом установлено, что только кумаровая кислота способна оказывать защитное действие на кратковременное УФ-С-облучение исследуемых растений (*V.amurensis* и *P.jezoensis*) и стимулировать продукцию стильбенов. Согласно полученным результатам З.В.Огневой сделан вывод об УФ-защитных свойствах стильбенов и их предшественников.

Как следует из полученных в диссертационной работе результатов, автором была предпринята попытка усиления биосинтеза вторичных метаболитов полифенольной природы путем внесения в геном винограда (*V.amurensis*) дополнительных копий гена STS, кодирующего фермент стильбенсинтазу, клонированных из генома ели (*P.jezoensis*), а также собственных, клонированных из генома винограда. В результате этого цикла работ были получены весьма интересные данные, связанные с усилением биосинтеза стильбенов путем трансформации культур клеток винограда генами *PjSTS* ели и созданием клеточной линии винограда ZST3-2, которую можно использовать в качестве линии-биопродуцента стильбенов.

Для выявления роли стильбенов в проявлении защитных ответных реакций растений на стрессовые воздействия, диссертантом были созданы модельные трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, в геном которых перенесены гены *VaSTS1* и *VaSTS7* из генома винограда. Полученные диссертантом экспериментальные данные свидетельствовали о том, что оба гена существенно отличались по способности кодируемых ими ферментов усиливать биосинтез стильбенов. Трансгенные растения с геном *VaSTS1* накапливали на 2-3 порядка больше стильбенов по сравнению с трансгенными растениями, несущими ген *VaSTS7*, что напрямую коррелировало с устойчивостью к воздействию УФ. На основании полученных данных диссертантом сделан вывод о возможности защиты растений от жестких диапазонов УФ-облучения (УФ-В и УФ-С) путем сверхэкспрессии генов *VaSTS*. По результатам выполненных экспериментальных работ диссертантом показано, что ключевым протектором растений от УФ облучения является транс-резвератрол.

Диссертационная работа З.В.Огневой, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки. Все демонстрационные материалы характеризуются высоким качеством представления.

Степень новизны, научная и практическая значимость результатов исследования

В диссертационной работе с использованием различных подходов – экзогенного нанесения стильбенов непосредственно на листовые поверхности растений, либо за счет эндогенного увеличения биосинтеза стильбенов посредством интеграции в растительный геном дополнительных копий генов, кодирующих стильбен синтазы, впервые показано положительное влияние как экзогенных, так и эндогенных (за счет сверхэкспрессии генов стильбен синтаз) стильбенов на устойчивость растения к жестким диапазонам УФ облучения. Несмотря на то, что диссертантом не выявлено достоверного влияния исследуемых способов индукции защитных реакций растений на холодовой или температурный стрессы, высокое содержание солей и засуху путем воздействия различных видов стильбенов, тем не менее полученные данные о формировании защитных реакций на УФ облучение представляют большой интерес как в теоретическом, так и практическом приложении. Интересными и

заслуживающими внимания для дальнейшего продолжения исследований являются данные по различиям всех трех независимо интегрированных инсерций генов *VaSTS1* и *VaSTS7*, что представляется важным и интересным с точки зрения более глубокого выявления причин наблюдаемого феномена. Созданная диссертантом клеточная линия винограда ZST3-2 может быть использована в биотехнологии в качестве линии-продуцента стильбенов.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных молекулярно-генетических и биохимических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе З.В.Огневой, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биологического и образовательного профиля, занимающихся изучением устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды, а также при чтении спецкурсов по генетике и биотехнологии растений. Полученные результаты и использованная экспериментальная стратегия могут стать основой для дальнейших биотехнологических исследований по конструированию генетически модифицированных растений, как для фундаментальных исследований, так и практических разработок.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации опубликованы в 7-ми работах в журналах из списка, рекомендованного ВАК, а также в 3-х работах по материалам региональных и международных научных конференций. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Замечания и комментарии к диссертационной работе

Оценивая в целом положительно диссертационную работу Огневой Златы Владимировны, следует отметить, что в диссертации имеются мелкие недочеты (некоторые стилистические погрешности, неудачные выражения типа «трансгенность», «белки, эспрессия которых...», «трансгенные сети», а также употребление слова хлопок для обозначения русской версии названия растения хлопчатника. Однако выявленные погрешности не носят принципиального характера и не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, а также не умаляют значения представленной работы, ее несомненную практическую ценность и научную значимость. Результаты диссертации представлены на нескольких международных конференциях и отражены в публикациях. Их достоверность, а также обоснованность выводов работы, не вызывают сомнения. Выводы, сделанные З.В.Огневой, полностью отражают изложенные в работе результаты и соответствуют поставленной цели и обозначенным для ее достижения задачам исследования. В целом, диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне и оставляет очень хорошее впечатление

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Огневой Златы Владимировны на тему «Влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стрессам» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области молекулярной биологии растений и биотехнологии.

По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа отвечает всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в Положение ученых степеней», а ее автор, Огнева Злата Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. – биотехнология (биологические науки).

Отзыв обсужден на заседании межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике» Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии Наук» (Протокол № 1 от «31» января 2022 г.).

Дейнеко Елена Викторовна,

доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика,
профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией
биоинженерии растений

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7-913-740-8108
эл.почта:deineko@bionet.nsc.ru
26 января 2022 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна
Ученый секретарь
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
кандидат биологических наук

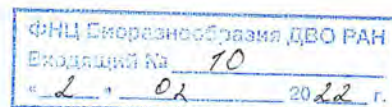


/Орлова Г.В./

Исполнитель:

Сидорчук Юрий Владимирович

т.



Председателю диссертационного
совета Д 99.0.064.02, созданного на
базе ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН,
доктору биологических наук, академику РАН,
профессору Журавлеву Ю.Н.

Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Огневой Златы Владимировны «Влияние сверхэкспрессии генов
стильбен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стресса», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. –
биотехнология (биологические науки).

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»
Адрес организации (с индексом)	630090, Российская Федерация, Новосибирск, пр-т. Академика Лаврентьева, 10
Официальный сайт организации	www.bionet.nsc.ru
Адрес электронной почты	icg-adm@bionet.nsc.ru
Сведения о профильном структурном подразделении	Лаборатория биоинженерии растений
Составитель отзыва	Дейнеко Елена Викторовна, главный научный сотрудник, руководитель лабораторией биоинженерии растений, доктор биологических наук
Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет	
1. Natalya V Permyakova, Tatyana V Marenkova, Pavel A Belavin, Alla A Zagorskaya , Yuriy V Sidorchuk, Elena A Uvarova, Vitaliy V Kuznetsov, Sergey M Rozov, Elena V Deineko. Assessment of the Level of Accumulation of the dIFN Protein Integrated by the Knock-In Method into the Region of the Histone H3.3 Gene of <i>Arabidopsis thaliana</i>. <i>Cells</i>. 2021 Aug 19;10(8):2137. doi: 10.3390/cells10082137 2. Sergey Mursalimov, Nobuhiko Ohno, Mami Matsumoto, Sergey Bayborodin, Elena Deineko. Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy Reveals That Intercellular Nuclear Migration Occurs in Most Normal Tobacco Male Meiocytes. <i>Frontiers in Plant Science</i>. 2021 May. 7;12:672642.doi: 10.3389/fpls.2021.672642. eCollection 2021. 3. Sergey Mursalimov, Nobuhiko Ohno, Elena Deineko. Intercellular nuclear migration in cryofixed tobacco male meiocytes. <i>Protoplasma</i>. 2021 doi.org/10.1007/s00709-021-01725-y 4. Сидорчук Ю.В., Т.В. Маренкова, В.В. Кузнецов, И.М. Герасименко, Ю.В. Шелудько, Дейнеко Е.В. Особенности экспрессии гена <i>uidA</i> под управлением тканеспецифичных промоторов генов <i>ap3</i> и <i>rpt2a</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> L. в трансгенных растениях <i>Nicotiana tabacum</i> L. <i>Физиология растений</i>. 2021. Т.68. №. 5. С.489-500. doi:10.31857/S0015330321040175 5. Загорская А.А., Дейнеко Е.В. Растительные экспрессионные системы – новый этап в производстве биофармацевтических препаратов. <i>Физиология растений</i>. Т.68. №1. С. 20-35. 2021 doi:10.31857/S0015330321010218	

6. Belavin P.A., N. V. Permyakova, A. A. Zagorskaya, T. V. Marenkova, Yu. V. Sidorchuk, E. A. Uvarova, S. M. Rozov, and **E. V. Deineko**. Peculiarities in Creation of Genetic Engineering Constructions for Knock-In Variant of Genome Editing of *Arabidopsis thaliana* Cell Culture. Russian Journal of Plant Physiology, 2020, Vol. 67, No. 5, pp. 855–866.
7. Пермякова Н.В., Сидорчук Ю.В., Маренкова Т.В., Загорская Т.В., **Дейнеко Е.В.** Доставка компонентов системы CRISPR/Cas9 в геном клеток суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana*. *Методы редактирования генов и геномов* (Новосибирск, Издательство СО РАН). 2020. С.73-86.
8. Rozov S.M., Permyakova N.V., **Deineko E.V.** The problem of the low rates of CRISPR/Cas9-mediated knock-ins in plants: approaches and decisions. Int J of Mol Sc. 2019. 20, 3371; doi:10.3390/ijms20133371
9. Natal'ya V. Permyakova, Yury V. Sidorchuk, Tat'yana V. Marenkova, Sof'ya A. Khozeeva, Vitaly V. Kuznetsov, Alla A. Zagorskaya, Sergei M. Rozov, **Elena V. Deineko**. CRISPR/Cas9-mediated gfp gene inactivation in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. Mol.Biol.Reports. 2019. V. 46. P.5735–5743 <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05007-y>
10. Маренкова Т.В., В.В. Кузнецов, **Е.В. Дейнеко**. Особенности экспрессии чужеродных генов в сложноорганизованных инсерциях у трансгенных растений табака с мозаичным характером проявления гена *npr1*. Генетика. Т.57. №3. С.321-333. 2021. doi: 10.31857/S0016675821030103

Директор ИЦиС СО РАН
член-корреспондент РАН



Handwritten signature

Кочетов А.В.