

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Разяповича на диссертационную работу Огневой Златы Владимировны «Влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стрессам», представленную в диссертационный совет 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Актуальность исследования

Абиотические стрессовые факторы, такие как засуха, жара, гипотермия, ультрафиолетовое излучение и другие отрицательно влияют на рост, продуктивность и географическое распространение растений. В связи с этим является актуальным увеличение стрессоустойчивости растений, что позволит повысить количество и качество урожая и будет способствовать более широкому распространению культурных растений, в том числе, на огромных территориях России с преимущественно неблагоприятными условиями среды. При воздействии абиотических стресс-факторов в растениях наблюдаются множественные негативные изменения, включая повреждение клеток в результате образования активных форм кислорода (АФК). Таким образом, при воздействии любых стрессовых факторов развивается оксидативный стресс. Одним из важнейших механизмов обеспечения устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям является биосинтез многочисленных антиоксидантных соединений. Такие вещества могут быть полезны при ответе растений на засуху, жару, гипотермию, засоление, но особое значение они могут иметь при воздействии ультрафиолетового излучения. Одними из таких веществ являются стильбены, из которых наиболее широко известен *транс-резвератрол*. Более того, являясь антиоксидантами, стильбены в продуктах питания могут быть полезны и для здоровья человека, так как имеют

кардиопротекторные, антибактериальные и противоопухолевые свойства. Исходя из этого, представляется актуальным создание трансгенных растений с повышенной экспрессией генов стильбен синтаз. Часть диссертационной работы З.В. Огневой как раз посвящена созданию трансгенных растений с конститутивной экспрессией генов стильбен синтаз. Однако подробные молекулярно-биологические пути регулирования биосинтеза стильбенов на сегодняшний день изучены слабо, поэтому представляется актуальным поиск соответствующих ферментов, их генов, а также изучение влияния абиотических и биотических стрессовых факторов на молекулярно-биологические механизмы биосинтеза стильбенов. Поэтому исследования З.В. Огневой по комплексному изучению трансгенных растений и клеточных культур на содержание вторичных метаболитов, на устойчивость к абиотическим стресс-факторам представляются также актуальными. Работы З.В. Огневой по изучению биосинтеза стильбенов при обработке молекулами-предшественниками способствуют раскрытию механизмов продукции этих метаболитов. В исследованиях стильбенов обычно используется только один модельный объект. В работе З.В. Огневой использовано два модельных объекта: культуры клеток винограда амурского и трансгенные растения *Arabidopsis thaliana*, что позволяет проводить более комплексные исследования и сделать больше выводов по механизмам биосинтеза стильбенов в растениях.

Структура диссертационной работы

Диссертация З.В. Огневой изложена на 111 страницах текста, состоит из Введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», главы «Результаты», главы «Обсуждение», Выводов и Списка литературы. Работа иллюстрирована 16 рисунками и содержит 7 таблиц. Список литературы насчитывает 232 наименования.

Во введении З.В. Огнева дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы (анализ участия стильбен синтаз и стильбенов в формировании устойчивости растений к абиотическим стрессам и создание альтернативных источников стильбенов) и формулирует задачи,

необходимые для достижения поставленной цели, приводит положения, выносимые на защиту, дает авторскую оценку научной новизны и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы. Диссертационная работа характеризуется высоким уровнем личного вклада соискателя во всех проведенных экспериментальных работах. Диссертационная работа прошла апробацию на 6 всероссийских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 10 публикациях, из которых 7 – статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК. Положительной стороной работы является то, что результаты исследования опубликованы в таких высокорейтинговых журналах, как *Phytochemistry*, *Journal of Plant Physiology*, *Acta Physiologiae Plantarum*, *Biologia Plantarum*, *Plants*.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена подробному рассмотрению абиотических стресс-факторов и механизмов защитного ответа растений. Дается представление о влиянии на растения повышенной и пониженной температуры, засухи, солевого стресса и ультрафиолетового излучения. Во второй части подробно описываются литературные данные о механизмах устойчивости растений к абиотическим стрессам. Отдельно рассматривается роль стильбенов в устойчивости растений к абиотическим стрессам. В целом, при прочтении обзора литературы формируется общее представление о стильбенах и об их роли при обеспечении стрессоустойчивости растений.

Необходимо отметить, что З.В. Огнева провела весьма значительную аналитическую работу с большим числом литературных данных, в том числе опубликованных за последние 5 лет, которые включены в список цитированной литературы. Обзор литературы непосредственно связан с предметом исследований и в нем достаточно полно отражены современные тенденции исследований механизмов биосинтеза стильбенов. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию ряда нерешенных

проблем в рассматриваемой области, на решение которых и была направлена диссертационная работа З.В. Огневой.

В главе «Материалы и методы» приведены краткая характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов физико-химической биологии. Положительной особенностью диссертационной работы является широкое использование трансгенных модельных систем, определение содержания метаболитов при помощи ВЭЖХ. Также в ходе работы проводилось бисульфитное секвенирование для выяснения причин низкого уровня экспрессии трансгенов. Протоколы методов изложены достаточно подробно для возможного повтора экспериментов другими исследователями. Также в этой главе приводится описание методов статистической обработки полученных экспериментальных данных.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования. Первая часть главы 3 посвящена изучению биосинтеза стильбенов в растениях при обработке кумаровой и кофейной кислотами после облучения ультрафиолетом. Этой очень важной частью работы, так как автор здесь доказывает, что обработка растений предшественниками стильбенов повышает содержание последних, что увеличивает устойчивость к УФ-С. Таким образом, исходя из этих данных, можно планировать дальнейшую работу по стимуляции биосинтеза стильбенов в трансгенных растениях. Далее автор описывает эксперименты по созданию трансгенных растений *A. thaliana* и клеток винограда амурского. З.В. Огневой была доказана успешность генетической трансформации и высокий уровень экспрессии трансгенов. Низкий уровень экспрессии трансгенов *VaSTS7* в *A. thaliana* был объяснен его высоким уровнем метилирования. В ходе дальнейших исследований автору удалось доказать, что сверхэкспрессия генов стильбен синтаз приводит к увеличению продукции различных стильбенов, в особенности, *транс-резвератрола*. Причем, то, какие именно стильбены синтезируются, зависело от используемого трансгена. Дальнейшие исследования были посвящены

определению устойчивости трансгенных растений *A. thaliana* к засухе, солевому, высоко- и низкотемпературному стрессам. Однако статистически значимого эффекта не было. В то же время позитивный эффект конститутивной экспрессии генов стильбен синтаз удалось доказать в случае воздействия ультрафиолетового излучения. Таким образом, автором продемонстрирована возможность использования генов стильбен синтаз для повышения устойчивости растений к ультрафиолетовому излучению.

Обсуждение результатов приводится в отдельной главе 4. Здесь автор обсуждает возможные причины различного влияния разных трансгенов на содержание стильбенов. Также есть обсуждение возможных причин разного уровня экспрессии трансгенов. Большая часть обсуждения посвящена теоретическому обоснованию взаимосвязи предшественников стильбенов, генов стильбен синтаз, содержания стильбенов и устойчивости растений к ультрафиолетовому излучению.

Выводы сформулированы четко, непосредственно вытекают из полученных данных и не вызывают вопросов. Диссертационная работа З.В. Огневой, в целом, написана хорошим научным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением литературных данных.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что впервые было показано, что сверхэкспрессия генов стильбен синтаз достоверно увеличивает общее содержание и продукцию стильбенов в культуре клеток винограда, увеличивает устойчивость растений *A. thaliana* к ультрафиолетовому излучению за счет биосинтеза стильбенов. Показано защитное действие *транс*-резвератрола против ультрафиолета при обработке листьев растений *A. thaliana*. Полученные результаты могут быть использованы для создания методик защиты сельскохозяйственных культур от повышенного ультрафиолетового излучения, а также создания генетических конструкций и

методологических подходов коммерческими компаниями для повышения устойчивости растений к ультрафиолету и биосинтеза стильбенов в них. Более того, увеличение содержания стильбенов в тканях культурных растений может увеличивать полезность получаемой продукции для питания человека.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

Использование для исследований современных методов физико-химической биологии, в особенности ВЭЖХ, подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе З.В. Огневой, а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выборка достаточна, а выбранные методы статистического анализа правильные. Приведенные данные в таблицах и гистограммах позволяют проверить соответствующими методами правильность расчетов, сделанных диссертантом. Автор тщательно проверяет полученные данные, оценивает достоверность различий с использованием стандартных методов статистики. Таким образом, полученные З.В. Огневой научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что основные результаты диссертации З.В. Огневой опубликованы в рецензируемых журналах и апробированы в научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

В ходе чтения к диссертационной работе возникли следующие вопросы:

1. Чем объясняется то, что обработка растений УФ-С/СаА оказывала меньше позитивного эффекта, чем обработка СА при действии УФ-С?
2. Почему в случае с елью *P. jezoensis* использовали обработку кофейной и кумаровой кислотами, а в случае с *V. amurensis* обрабатывали только кумаровой кислотой?
3. С чем можно объяснить более высокий уровень метилирования трансгена *STS7* по сравнению с трансгеном *STS1* в трансгенных растениях *A. thaliana*?

4. Стр. 80, рис. 14. Почему в случае с UV-B и UV-C изучали выживаемость листьев, а в случае с другими стрессовыми факторами целые растения?

К диссертационной работе имеется несколько замечаний.

В диссертации очень кратко описывается научная новизна работы. И поэтому не всегда понятно, получил автор те или данные впервые или же такие результаты ранее уже получали и другие исследователи. Результаты анализов ОТ-ПЦР в русскоязычной литературе принято обозначать в виде показателя «относительное содержание транскриптов», а не «относительная экспрессия». Также вместо термина «уровень транскрипции» целесообразнее использовать термин «относительное содержание транскриптов». На стр. 37 говорится об обработке растений абиотическим стрессом. Более правильно говорить об обработке растений абиотическими стресс-факторами.

Также можно отметить несколько замечаний редакторского характера:

- 1) Стр. 10.повешенными температурами...
- 2) Первое предложение на стр. 12 не согласовано.
- 3) Стр. 21.замедляя рост и урожайность растений....
- 4) Последнее предложение на стр. 28 не согласовано.
- 5) Стр. 49. ...неомецин-фосфотрансферазу...
- 6) Подпись к рис. 2 на стр. 51.веторов....

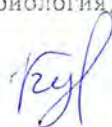
Сделанные в отзыве замечания не влияют на актуальность, новизну, практическую значимость и фундаментальный характер полученных выводов диссертационной работы.

Заключение

Диссертационное исследование З.В. Огневой «Влияние сверхэкспрессии генов стильбен синтаз на устойчивость растений к абиотическим стрессам», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные о взаимосвязи между предшественниками стильбенов, генами стильбен синтаз и

стильбенами. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а ее автор Огнева Злата Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

Ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Института биохимии и генетики – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, доктор биологических
наук (03.01.03 – молекулярная биология)

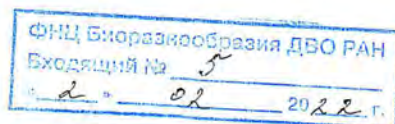


Булат Разяпович Кулуев

28.01.2022 г.

Адрес: 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71
ibg.anrb.ru, e-mail: molgen@anrb.ru, kuluev@bk.ru
Тел.: +7 (347) 2356100, +7 (347) 2356088

Подпись Кулуева Б.Р.



Сведения об официальном оппоненте

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

1. Кулуев Булат Разяпович
2. Год рождения: 1982, Гражданство: РФ
3. Почтовый адрес 450054, Уфа, Проспект октября, 71
4. Телефон.: +7 (347) 235-61-00
5. e-mail: kuluev@bk.ru
6. Место основной работы: ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН (ИБГ УФИЦ РАН)
7. Ученая степень: доктор биологических наук
8. Ученое звание: нет
9. Специальность по докторской диссертации: 03.01.03. Молекулярная биология.
10. Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет:
 1. Kuluev B.R., Mikhaylova E.V., Berezhneva Z.A., Nikonorov Y.M., Postrigan B.N., Kudoyarova G.R., Chemeris A.V. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco NtEXGT gene and its involvement in abiotic stress response // Plant Physiology and Biochemistry. 2017. V. 111. P. 203–215.
 2. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Knyazev A.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris A.V. Role of PtrXTH1 and PnXTH1 genes encoding xyloglucan endo-transglycosylases in regulation of growth and adaptation of plants to stress factors // Russian Journal of Plant Physiology, 2018, Vol. 65, No. 1, pp. 38–48.
 3. Kuluev B.R., Berezhneva Z.A., Mikhaylova E.V., Chemeris A.V. Growth of transgenic tobacco plants with changed expression of genes encoding expansins under the action of stress factors // Russian Journal of Plant Physiology. 2018. Vol. 65. No. 2. P. 211–221.
 4. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Nikonorov Y.M., Ermoshin A.A., Yuldashev R.A., Akhiarova G.R., Shakirova F.M., Chemeris A.V. Effect of constitutive expression of Arabidopsis CLAVATA3 on cell growth and possible role of cytokinins in leaf size control in transgenic tobacco plants // Journal of Plant Physiology. 2018. V. 231. P. 244-250.
 5. Gumerova G.R., Chemeris A.V., Nikonorov Yu.M., Kuluev B.R. Morphological and molecular analysis of isolated cultures of tobacco adventitious roots obtained by the methods of biolistic bombardment and Agrobacterium-mediated transformation // Russian Journal of Plant Physiology. 2018. V. 65. No. 5. P. 740–749.
 6. Kuluev B., Mikhaylova E., Ermoshin A., Veselova S., Tugbaeva A., Gumerova G., Gainullina K., Zaikina E. The ARGOS-LIKE genes of Arabidopsis and tobacco as targets for improving plant productivity and stress tolerance. Journal of Plant Physiology. 2019. 242:153033.

-
7. Kuluev B.R., Gumerova G.R., Mikhaylova E.V., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Vershinina Z.R., Khyazev A.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Delivery of CRISPR/Cas components into higher plant cells for genome editing // Russian Journal of Plant Physiology. 2019. Vol. 66. No. 5, pp. 694–706.
 8. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A. Kuluev B.R. Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. Molecular Biology. 2020. V. 54. P. 24–42.
 9. Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova A., Korobova A., Ivanov I., Dodd I., Kuluev B., Kudoyarova G. Effects of phosphate shortage on root growth and hormone content of barley depend on capacity of the roots to accumulate ABA. Plants. 2020. V. 9. 1722