

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Кулуева Булата Рязяповича на диссертационную работу Киселева Константина Вадимовича «Регуляция биосинтеза и значение стильбенов в клетках растений», 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 доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

Актуальность исследования

Растения являются источниками многих ценных биологически активных веществ, поэтому исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов их биосинтеза, представляются актуальными. Резвератрол и другие стильбены являются вторичными метаболитами растений перспективными для использования в качестве БАДов, однако их стоимость остается очень высокой, а спрос продолжает расти. В этой связи актуальность рассматриваемой диссертационной работы заключается в том, что детально изучены альтернативные источники стильбенов. С другой стороны представляет большой интерес биотехнологические способы производства растительных вторичных метаболитов, где могут быть использованы различные индукторы их биосинтеза. Поэтому важно подробно изучить молекулярные механизмы биосинтеза ценных биологически активных веществ, каковыми являются резвератрол и другие стильбены. Более того, интерес представляет выяснение функций этих ценных соединений для самих растений. При этом полученные знания могут быть использованы в растениеводстве для увеличения урожайности и стрессоустойчивости сельскохозяйственных и садовых культур. Диссертационное исследование К.В. Киселева посвящено поиску альтернативных источников, изучению молекулярных механизмов биосинтеза и определению значения для растений стильбенов, поэтому является актуальным как для биотехнологии, так и биологии растений в целом.

Структура диссертационной работы

Диссертация Киселева К.В. изложена на 206 страницах текста, состоит из Введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждение», Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа иллюстрирована 33 рисунками и содержит 20 таблиц. Список литературы насчитывает 354 наименования.

Во введении К.В. Киселев дает обоснование актуальности выбранной темы, четко определяет цель работы 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. Основные результаты были получены лично автором, либо под его непосредственным руководством. Диссертационная работа прошла апробацию на 12 российских и международных научных конференциях, результаты исследования изложены в 71 публикации, из которых 57 – статьи в журналах, рекомендованных перечнем ВАК. Весьма примечательной и положительной стороной работы является то, что результаты исследования опубликованы в высокорейтинговых журналах, к примеру, это журналы *Journal of Biotechnology*, *Journal of Plant Physiology*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *Acta Physiologiae Plantarum*, *Plant Growth Regulation*, *Planta*, *Plant Cell Reports* и другие. В списке опубликованных работ имеются также и российские журналы.

В литературном обзоре диссертант подробно освещает современное состояние изучаемой проблемы. Первая часть обзора литературы посвящена описанию стильбенов, их распространению и значению для растений. Также дается информация о биологически активных свойствах *m*-резвератрола и других стильбенов. Вторая часть обзора литературы посвящена подробному рассмотрению регуляции биосинтеза *m*-резвератрола и других стильбенов. В обзоре литературы дается информация о регуляции биосинтеза стильбенов стресс-факторами, кальциевой сигнальной системой, активными формами кислорода, фитогормонами, транскрипционными факторами и метилированием. Последний параграф обзора литературы посвящен описанию значения предшественников вторичных метаболитов и доступности питательных веществ для биосинтеза стильбенов.

Обзор литературы очень подробный, написан понятным языком, содержит много современной научной информации и может быть рекомендован для использования в учебном процессе у студентов биологических специальностей. При прочтении обзора формируется общее представление об известной информации о стильбенах, регуляции их биосинтеза, значения для растений и возможного их применения в медицине и сельском хозяйстве.

Необходимо отметить, что К.В. Киселев провел 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 функций стильбенов и их значении в растительном организме. При прочтении обзора литературы возникает понимание научной новизны и практической значимости диссертационной работы. В целом ознакомление с обзором литературы подводит читателя к существованию большого числа вопросов и проблем в рассматриваемой области, на решение которых и была направлена диссертационная работа К.В. Киселева.

В главе «Материалы и методы» приведены краткая характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Работа характеризуется использованием современных методов биотехнологии и физико-химической биологии. Положительной особенностью диссертационной работы является широкое использование трансгенных модельных систем, а также точная идентификация и определение содержания стильбенов методом ВЭЖХ. В главе 2 описываются методы выделения и анализа нуклеиновых кислот, определения уровня экспрессии генов, различных методов выделения растительных экстрактов, их анализа, экзогенной обработки растений, морфофизиологических анализов растений и т.д. В целом, протоколы в главе «Материалы и методы» описаны достаточно подробно и позволяют провести повторные эксперименты другими исследователями.

Самая большая глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования и их обсуждению. Первая часть главы 3 посвящена описанию и обсуждению результатов изучения накопления стильбенов у разных растений: ели аянской *P. jezoensis*, сосне корейской *P. koraiensis* и винограде амурском *V. amurensis*, а также в каллусных культурах винограда амурского. Далее даются результаты и обсуждение результатов исследования содержания стильбенов в трансгенных каллусах винограда амурского сверхэкспрессирующих гены *rol*, кальциевых сенсоров растений, транскрипционных факторов и стильбен синтаз. Автором также были получены трансгенные растения арабидопсиса, сверхэкспрессирующие гены стильбен синтаз и проведен их подробный анализ, в том числе изучена их стрессоустойчивость. В следующей части главы 3 приводятся данные по обработке семян и растений предшественниками фенольных соединений и стильбенами. Последний параграф главы 3 посвящен результатам и обсуждению по экспрессии генов метаболизма фитогормонов и защитных генов арабидопсиса при обработке предшественниками фенольных соединений и стильбенами.

После главы 3 дается заключение по всем полученным в ходе работы результатам исследования. В заключении говорится об актуальности работы, кратко перечисляются самые важные результаты исследования, характеризующиеся научной новизной, и дается авторская оценка практической значимости проведенной работы. Здесь же дается авторская модель передачи сигнала, приводящая к активации биосинтеза стильбенов в клетках растений. В заключении также приведена схема действия стильбенов в растениях. Благодаря этим двум схемам и их описанию возникает общее представление о функционировании сигнальной сети клеток растений, в которые вовлекаются стильбены.

Выводов приводится 7, сформулированы они четко, непосредственно вытекают из полученных данных и понятны для читателя. Диссертационная работа К.В. Киселева написана хорошим научным и понятным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки и обсуждены с привлечением широкого круга литературных данных. В целом, в тексте допущено мало ошибок, текст изложен в логичном порядке и при прочтении возникает четкое убеждение о целостности и завершенности диссертационной работы.

После чтения всей диссертационной работы необходимо отметить основные положительные моменты. В обзоре литературы очень подробно описаны пути биосинтеза стильбенов и их полезные для человека свойства. Автором обнаружены альтернативные источники стильбенов, спрос на которые растет и полученные сведения могут быть использованы при создании новых агропрепаратов для сельскохозяйственных культур и новых биологически активных добавок для человека. Несмотря на очень большое количество экспериментальных данных и проведенных исследований автору удалось все эти результаты описать кратко и доступно для читателя. Все результаты исследования тщательно статистически обработаны, опубликованы в высокорейтинговых журналах, что говорит об очень высоком уровне работы в целом, а все полученные данные вызывают полное доверие. В целом, диссертационное исследование К.В. Киселева – это фундаментальный и довольно сложный научный труд, так как там описывается большое количество экспериментов и исследований, а полученные результаты тщательно обсуждаются с привлечением литературных сведений.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

В рамках данной диссертационной работы К.В. Киселевым впервые проведен детальный анализ молекулярных механизмов регуляции биосинтеза стильбенов и показана важная роль кальциевой сигнальной системы и фитогормонов. Более того, автору в ходе работы удалось идентифицировать некоторые гены протеинкиназ и факторов транскрипции, белковые продукты которых непосредственно участвуют в регуляции биосинтеза стильбенов. Найден наиболее богатый источник стильбенов среди доступных растительных источников – кора ели аянской, где общее содержание стильбенов достигало 251 мг/г сухого веса коры. Впервые показано, что внешняя обработка растений водными растворами стильбенов и трансформация генами *STS* растений оказывает значительное защитное действие против губительного ультрафиолетового облучения. В ходе многочисленных экспериментов доказано, что стильбены сами по себе являются регуляторами защитных свойств растений и их действие в клетках растений выходит за простое предположение об их прямом влиянии на патогены или на АФК. Большое практическое значение имеет обнаруженный автором факт о наибольшем содержании стильбенов в коре хвойных деревьев. Экстракты коры хвойных растений могут быть предложены для применения в растениеводстве для повышения устойчивости к УФ-излучению и жаре. С учетом того, что *m*-резвератрол применяется в качестве БАДа, то альтернативные источники стильбенов также могут быть предложены для использования в медицине.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

Использование для исследований современных методов биотехнологии и физико-химической биологии таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, генно-инженерные технологии, секвенирование, ПЦР в реальном времени и др. подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе К.В. Киселева, 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 К.В. Киселевым научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует еще раз отметить и то, что основные результаты диссертации К.В. Киселева

опубликованы в высокорейтинговых журналах, а также 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. Можно ли использовать кору хвойных растений в народной медицине с целью получения лечебного эффекта от стильбенов, есть ли какие-либо литературные данные об этом?

2. Почему в таблице 1 приводятся данные для СССР на 1994 г, хотя к этому времени СССР уже не существовало?

3. Стр. 140. Сообщается, что сверхэкспрессия трансгена *VaSTS11d*, содержащего 135 bp интрон, приводила к более сильной экспрессии трансгена и накоплению стильбенов, чем трансген без интронов. С чем может быть связан этот эффект?

4. Сообщается, что было выявлено уменьшение уровня экспрессии трансгена и увеличение его метилирования в ряду поколений трансгенных растений. Эта закономерность присущая многим трансгенам или это относительно редкое явление?

5. С чем может быть связан отрицательный эффект экзогенных стильбенов на проростки арабидопсиса?

6. Как на практике можно использовать полученные данные о негативном влиянии обработки стильбенами на устойчивость растений к замораживанию?

К диссертационной работе имеется несколько замечаний.

По тексту диссертации нередко даются одновременно латинское и русское названия растений, к примеру, арабидопсис *A. thaliana*. Правильнее после первого упоминания приводить только сокращенное латинское или только русское название. В обзоре литературы фамилии многих авторов переведены с английского на русский и в итоге в тексте приводятся как на английском, так и на русском вариантах. Во-первых, это трудоемко при написании и занимает много места в тексте, во-вторых, фамилии зарубежных ученых могут быть неправильно переведены на русский. Несмотря на то, что русскоязычный термин, обозначающий «hairy roots» окончательно не принят научным сообществом России, все же правильнее использовать термин «волосовидный корень», предложенный российским фитопатологом И.Л. Сербиновым еще в 1912 году. Термин «волосатый корень» менее предпочтителен для использования в научной литературе. В главе 1 «Обзор литературы» нет заключения, который должен подвести к цели исследования. Результаты анализов ОТ-ПЦР в русскоязычной литературе

правильнее обозначать в виде показателя «относительное содержание транскриптов», а термины «уровень экспрессии» и «уровень транскрипции» менее предпочтительны. Вывод №7 требует большей конкретики, к примеру, его можно было бы поделить на два и дать более подробную информацию о конкретных генах, которые активируются под действием стильбенов.

Также можно отметить несколько замечаний редакторского характера:

1. Стр. 8. полигонум – спорыш.
2. Стр. 13. многофакторный дисперсный анализ - многофакторный дисперсионный анализ.
3. Подпись к рисунку 2. Стильбенсинтаза – написана слитно.
4. Стр. 57. Все аббревиатуры фитогормонов расшифрованы, кроме салициловой кислоты.
5. экотип Колумбия – обычно пишут на английском.
6. Стр. 69. Неомицинтрансфераза – неомицинофосфоттрансфераза.
7. Институт Макса-Планка – лучше приводить полное название института.
8. База данных ГенБанк – лучше использовать GenBank, так как ГенБанк – это один из очень известных российских банков.
9. Стр. 99. Плоды сосны корейской – правильное семена или шишки сосны корейской.
10. Стр. 121. «в геномном банке NCBI» – лучше использовать «в GenBank».

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

Заключение

Диссертационное исследование К.В. Киселева «Регуляция биосинтеза и значение стильбенов в клетках растений», представленное на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные об альтернативных источниках, молекулярных механизмах биосинтеза и значении для растений стильбенов. 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 Киселев Константин Вадимович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки).

доктор биологических наук
по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология,
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

Булат Разяпович Кулуев

27.12.2024 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. заверяю,
ио директора ИБГ УФИЦ РАН



Карунас А.С.

Сведения об оппоненте

по диссертационной работе **Киселева Константина Вадимовича**
на тему «**Регуляция биосинтеза и значение стильбенов в клетках растений**»,

представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Фамилия Отчество оппонента	Имя	Кулуев Булат Разяпович
Шифр наименование специальностей, по которым защищена диссертация	и	03.01.03 – молекулярная биология
Ученая степень отрасль науки	и	Доктор биологических наук
Ученое звание		нет
Полное наименование организации, являющейся основным местом работы оппонента		Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Занимаемая должность		Ведущий научный сотрудник лаборатории геномики растений
Почтовый адрес	индекс,	450054, г. Уфа, Проспект октября, 71
Телефон		+7 (347) 235-61-00
Адрес электронной почты		kuluev@bk.ru
Список основных публикаций официального оппонента по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)		1. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R. , Kiryanova O.Y., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev A.K., Gubaidullin I.M., Baimiev A.K., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing // Molekuliarnaia biologiiia. 2020. Vol. 54, No. 1, P. 29–50. 2. Vysotskaya L., Akhiyarova G., Feoktistova A., Akhtyamova Z., 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. Vol. 9, No. 12, 1722.

Mikhaylova E.V., Artyukhin A., Musin K., Panfilova M., Gumerova G., **Kuluev B.** The first report on the induction of hairy roots in *Trapa natans*, a unique aquatic plant with photosynthesizing roots // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2021. Vol. 144, No. 2, P. 485–490.

3. Musin K.G., Fedyaev V.V., **Kuluev B.R.** State of antioxidant system and long-term storage of tobacco hairy roots with constitutive expression of glutathione-S-transferase gene *ATGSTF11* // Russian Journal of Plant Physiology. 2021. Vol. 68, P. 641–651.

4. Korobova A., **Kuluev B.**, Möhlmann T., Veselov D., Kudoyarova G. Limitation of cytokinin export to the shoots by nucleoside transporter ENT3 and its linkage with root elongation in Arabidopsis // Cells. 2021. Vol. 10, No. 2, 350.

5. Mikhaylova E., Khusnutdinov E., Shein M.Y., Alekseev V.Y., Nikonorov Y., **Kuluev B.** The role of the *GSTF11* gene in resistance to powdery mildew infection and cold stress // Plants. 2021. Vol. 10, No. 12, 2729.

6. **Kuluev B.R.**, Mikhailova E.V., Kuluev A.R., Galimova A.A., Zaikina E.A., Khlestkina E.K. Genome editing in species of the tribe Triticeae with the CRISPR/Cas system // Molekuliarnaia biologiya. 2022. Vol. 56, No. 6, P. 949–968.

7. Lastochkina O., Ivanov S., Petrova S., Garshina D., Lubyanova A., Yuldashev R., **Kuluev B.**, Zaikina E., Maslennikova D., Allagulova C., Avtushenko I., Yakupova A., Farkhutdinov R. Role of endogenous salicylic acid as a hormonal intermediate in the bacterial endophyte *Bacillus subtilis*-induced protection of wheat genotypes contrasting in drought susceptibility under dehydration // Plants. 2022. Vol. 11, No. 23, 3365.

8. Sharipova G., Ivanov R., **Kuluev B.**, Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G. Effects of constitutive expression of barley aquaporin gene, *HVPIP2;1*, on water relations and growth of tobacco plants under normal conditions and salinity and their linkage with capacity for osmotic adjustment // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 1, P. 10.

9. Musin K.G., Gumerova G.R., Baimukhametova E.A., **Kuluev B.R.** Growth and stress resistance of tobacco

hairy roots with constitutive expression of *ARGOS-LIKE* gene // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 5, P. 92.

10. **Kuluev B.R.**, Ermoshin A.A., Mikhaylova E.V. Overexpression of the glutathione S-transferase *ATGSTF11* gene improves growth and abiotic stress tolerance of tobacco transgenic plants // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 7, P. 148.

11. Mikhaylova E.V., Khusnutdinov E.A., Chemeris A.V., **Kuluev B.R.** Available toolkits for CRISPR/CAS genome editing in plants // Russian Journal of Plant Physiology. 2022. Vol. 69, No. 1.

12. **Kuluev B.**, Uteulin K., Bari G., Baimukhametova E., Musin K., Chemeris A. Molecular genetic research and genetic engineering of *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin // Plants. 2023. Vol. 12, No. 8, P. 1621.

13. Баймухаметова Э.А. Швец Д.Ю., Мусин Х.Г., **Кулуев Б.Р.** Количественное определение содержания инулина в волосовидных корнях цикория обыкновенного *Cichorium intybus* L. // Журнал Сибирского федерального университета. Биология, 2023. 16(2). С. 218–231.

14. Aleksandrova V.M., Gumerova G.R., Musin Kh.G., Berezhneva Z.A., A.A. Galimova, **Kuluev B.R.** Isolated green root cultures of *Triticum aestivum* L. capable of unlimited growth on hormone-free nutrient media. Russian Journal of Plant Physiology, 2024, Vol. 71:90

15. Mikhaylova, E.V. **Kuluev B.R.**, Gerashchenkov G.A., Chemeris A.V. Prime-Editing Methods and pegRNA Design Programs. Mol Biol. 2024. V. 58. P. 17–32.

Учёный секретарь
ИБГ УФИЦ РАН

« 3 » октября 2024 г.



М.А. Бермишева