

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Христенко Валерии Сергеевны «Роль генов кальций-зависимых протеинкиназ *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в устойчивости винограда *Vitis amurensis* Rupr. к абиотическим стрессам», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Понимание молекулярно-генетических механизмов адаптивных ответов на неблагоприятные факторы окружающей среды является необходимой предпосылкой для создания сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к этим факторам. Многочисленные исследования последних лет показали, что большинство таких адаптивных ответов зависит от изменений в экспрессии определенных генов. Важными посредниками в передаче сигналов при этом являются белки, реагирующие на изменения в уровне  $Ca^{2+}$ , такие как кальций-зависимые протеинкиназы (CDPK). Диссертационная работа В.С. Христенко посвящена исследованию роли генов семейства кальций-зависимых протеинкиназ в адаптивных ответах растений винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. на неблагоприятные абиотические факторы: избыток соли, водный дефицит, осмотический и температурные стрессы. В качестве исследуемых генов были выбраны *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29*, для которых ранее были обнаружены изменения в уровнях экспрессии при действии изучаемых абиотических факторов.

Диссертационная работа В.С. Христенко построена по традиционной схеме и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 100 страницах, иллюстрирована 24 рисунками и содержит 9 таблиц. Список литературы включает 144 ссылки.

Во введении кратко охарактеризовано современное состояние области исследования, сформулированы основная цель и конкретные задачи работы, достаточно убедительно обоснована ее актуальность, новизна и практическая значимость. Возможно, в этом разделе не хватает более обстоятельного обоснования целесообразности проведения существенной части исследований

на трансгенных растениях арабидопсиса. Учитывая сформулированную автором цель работы, более естественным кажется использование трансгенных растений винограда амурского. И хотя о причинах выбора арабидопсиса нетрудно догадаться специалисту в данной области, для более широкой аудитории подробное объяснение этих причин не было бы лишним.

В довольно компактном, но информативном обзоре литературы рассмотрены основные особенности использованных в диссертационной работе модельных объектов – винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. (главного объекта) и резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. («вспомогательного» объекта), роль различных генов в адаптивных ответах растений на неблагоприятные абиотические факторы, роль кальция и кальций-связывающих белков в системах передачи сигналов в клетках растений, структура и функции кальций-зависимых протеинкиназ, молекулярные механизмы устойчивости растений к абиотическим стрессам и возможности создания устойчивых к таким стрессам трансгенных растений. Отдельно рассмотрены экспериментальные данные по экспрессии генов семейства *CDPK* в растениях винограда амурского под влиянием абиотических стрессов. Следует подчеркнуть, что эти данные, полученные при непосредственном участии самой диссертантки и опубликованные в высокорейтинговом международном журнале, в сущности, легли в основу рассматриваемой диссертационной работы. В целом обзор литературы производит хорошее впечатление. В качестве мелких замечаний хотелось бы пожелать автору поменьше злоупотреблять буквальными переводами с английского языка на русский, такими как «ген вовлечен», «детоксифицировать АФК» и т.п. Лучше вместо этого писать «ген участвует», «обезвреживать АФК» и т.д. Этот и другие разделы работы содержат небольшое количество опечаток, неудачно скомпонованных предложений и даже одно неоконченное предложение (стр.14). Хотелось бы посоветовать автору при описании твердо установленных экспериментальных фактов использовать настоящее время, а прошедшее оставить для описания конкретных экспериментов. Подчеркнем, что все эти

замечания относятся лишь к стилю изложения и ни в коей мере не влияют на оценку фактического содержания работы.

В разделе «Материалы и методы» описаны методические подходы, использованные в диссертационной работе. При этом оригинальные аспекты методов описаны достаточно подробно, а общепринятые и ранее описанные в опубликованных статьях представлены ссылками на соответствующие литературные источники. В целом этот раздел свидетельствует о том, что автор хорошо владеет современным методическим арсеналом в данной области.

Результаты представлены в семи подразделах главы 3, соответствующих использованным в работе методическим подходам. И хотя в целом содержание этой главы представляется вполне корректным, хочется сделать несколько частных замечаний. Автор обозначил одним и тем же номером 3.6 два последних подраздела. Нам кажется излишними неоднократные описания в этом разделе методик, уже описанных в разделе «Материалы и методы». Например, подраздел 3.1 начинается с описания способа получения трансгенных культур *V. amurensis*, на странице 48 и 50 описаны способы индукции холодового и теплового стрессов, подраздел 3.4 начинается с описания способа получения трансгенных растений арабидопсиса и т.д. Вполне достаточно описания этих методик в разделе «Материалы и методы». На наш взгляд, не самой удачной является выбранная автором компоновка материала. Значение полученных результатов было бы гораздо удобнее анализировать, если бы они были сгруппированы не по методическим подходам, а по индивидуальным генам: сначала все результаты по гену *VaCDPK13* – от его экспрессии в трансгенных культурах винограда и трансгенных растениях арабидопсиса до фенотипических эффектов его экспрессии и возможной функциональной интерпретации, затем – то же самое для гена *VaCDPK20* и т.д. Это избавило бы читателя от необходимости снова и снова возвращаться к результатам более ранних подразделов при анализе возможной функциональной роли каждого из этих генов. Разумеется, мы не отрицаем права автора на свой вкус выбирать форму изложения экспериментальных

результатов. Что касается собственно содержательной части раздела «Результаты», она представляется вполне корректно представленной и весьма весомой в контексте решения поставленных задач. В порядке дискуссии хотелось бы отметить, что обсуждение тонких аспектов полученных результатов и их интерпретация могли бы быть менее лаконичными. Например, степень сверхэкспрессии гена *VaCDPK20* в трансгенных линиях КА09-I и КА09-IV практически одинакова (рис. 4В), в то время как положительный эффект на накоплении биомассы в условиях холодового стресса в линии КА09-IV существенно выше (рис.9Б). И, наоборот, в трансгенных растениях арабидопсиса линии 07-3 уровень экспрессии трансгена *VaCDPK21* в четыре раза выше, чем в линии 07-1 (рис.13Б), а эффекты на устойчивость к солевому стрессу в этих линиях практически одинаковы (рис.14Б). Очевидно, наблюдаемые фенотипические эффекты зависят не только от уровня экспрессии каждого из этих генов, но и каких-то других факторов. Во всяком случае, такие моменты заслуживают более обстоятельного обсуждения. Отметим также, что используемый автором термин «сверхэкспрессия» представляется не вполне удачным. В особенности это относится к трансгенным растениям арабидопсиса. В этом случае любая экспрессия трансгена является сверхэкспрессией по сравнению с контролем, в котором этот трансген отсутствует. Следует подчеркнуть, что высказанные замечания относятся к форме изложения результатов, но никак не умоляют их достоверности и корректности основных выводов. Излишне категоричным представляется лишь вывод об отсутствии существенной роли в реакциях на изученные абиотические стрессы у гена *VaCDPK13*: корректнее было бы просто констатировать, что экспериментальных свидетельств в пользу существования такой роли автору обнаружить не удалось.

Главным результатом выполненной В.С. Христенко диссертационной работы является экспериментальное обоснование роли генов *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* в механизмах устойчивости растений *V. amurensis* к абиотическим стрессам. Этот результат не только вполне оригинален, но и имеет очевидные

перспективы практического использования в сельскохозяйственной биотехнологии. В качестве пожелания на будущее хотелось бы предложить автору в дальнейшем изучить также влияние частичного (например, с помощью интерферирующих РНК) или полного (с помощью локального геномного редактирования) выключения генов *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29* на устойчивость растений *V. amurensis* к абиотическим стрессам.

В целом диссертационная работа В.С. Христенко представляется оригинальным выполненным на высоком методическом уровне исследованием актуальной проблемы современной сельскохозяйственной биотехнологии и молекулярной биологии растений. Сделанные выводы вполне обоснованы полученными экспериментальными результатами. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате. Основные результаты опубликованы в высокорейтинговых международных журналах и доложены на авторитетных научных конференциях.

Учитывая все вышесказанное, считаю, что диссертационная работа В.С. Христенко отвечает всем требованиям к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сама В.С. Христенко, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени – кандидат биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Старший научный сотрудник отдела молекулярных основ онтогенеза Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология  
10 мая 2018 года



(Ашапкин Василий Васильевич)

Адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

Телефоны: +7-495-939-54-12; +7-916-592-90-04

Электронная почта: ashapkin@genebee.msu.ru; basilashapkin@gmail.com.



### СВЕДЕНИЯ об официальном оппоненте

по диссертации Христенко В.С. на тему «Роль генов кальций-зависимых протеинкиназ *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в устойчивости винограда *Vitis amurensis* Rupr. к абиотическим стрессам» по специальности 03.01.06 биотехнология (в том числе бионанотехнологии) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по данной специальности.

Фамилия, Имя, Отчество официального оппонента	Ашапкин Василий Васильевич
Ученая степень, наименование научной специальности и отрасли науки, по которым защищена диссертация; ученое звание (при наличии)	д.б.н. по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, звания нет
Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом, являющейся основным местом работы	<i>Полное:</i> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». <i>Сокращенное:</i> НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
Структурное подразделение, должность	старший научный сотрудник  отдел молекулярных основ онтогенеза
Почтовый индекс, адрес организации	119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 40
Веб сайт	<a href="http://www.belozersky.msu.ru">http://www.belozersky.msu.ru</a>
Телефон	+7-916-592-90-04
Адрес электронной почты	basilashapkin@gmail.com
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	1) Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Эпигенетическая изменчивость у растений: наследуемость, адаптивность, эволюционное значение. Физиология растений, 2016, 63:191-204. 2) Petrakova O.S., Ashapkin V.V., Shtratnikova V.Y., et al. Valproic acid increases the hepatic differentiation potential of salivary gland cells ACTA NATURAE, 2015, 7:80-92. 3) Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Гены ДНК-метилтрансфераз растений: множественность, экспрессия, характер метилирования. Биохимия, 2016, 81:238-250. 4) Ашапкин В.В., Кутуева Л.И., Ванюшин Б.Ф. Dnmt2 – самая эволюционно консервативная и загадочная ДНК-метилтрансфераза эукариот. Генетика, 2016, 52:269–282. 5) Ashapkin V.V., Kutueva L.I., Vanyushin B.F. Aging as an epigenetic phenomenon. CURRENT GENOMICS, 2017, 18:385-407