

Отзыв официального оппонента на диссертацию

**Христенко Валерии Сергеевны**

**«РОЛЬ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ  
*VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* В  
УСТОЙЧИВОСТИ ВИНОГРАДА *VITIS AMURENSIS* RUPR. К  
АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ»,**

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Широко известно, что воздействие различных абиотических стрессовых факторов снижает урожайность и продуктивность сельскохозяйственных культур. В связи с этим изучение механизмов ответа растений на неблагоприятные условия окружающей среды на молекулярном уровне является актуальным.

Результаты данной работы являются продолжением экспериментов, проводимых в лаборатории биотехнологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Конкретные задачи диссертации связаны с изучением роли генов *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в устойчивости дикорастущего винограда *Vitis amurensis* к различным абиотическим стрессам. Автором впервые показано, что сверхэкспрессия *VaCDPK20*, *21*, *26* и *29*) в клеточных линиях *Vitis amurensis* и в растениях *Arabidopsis thaliana* увеличивает их устойчивость к абиотическим стрессам. Важно, что эти результаты важны для практического использования и могут быть использованы для создания генетических конструкций для создания растений устойчивых к абиотическим стрессам.

Данная диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы. Данная работа изложена на 100 страницах, содержит 24 рисунка и 9 таблиц. Автореферат полностью отражает содержание диссертации; материалы диссертации и

автореферата отражены в 5 статьях из списка ВАК. Кроме того, результаты данной работы были представлены на нескольких международных конференциях.

Литературный обзор соответствует задачам работы, достаточно полно охватывает рассматриваемую проблему, содержание обзора литературы изложено на 18 страницах. Список литературы насчитывает 144 наименования, из них 136 на английском языке. В целом работа хорошо написана, имеет логичную структуру и легко читается. Методы, использованные в работе, адекватны поставленным задачам и включают методы получения трансгенных каллусных клеточных линий растений, получение трансгенных растений, молекулярно-генетические методы и методы статистического анализа полученных результатов. Все методы использованы корректно, все эксперименты повторены многократно, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Выводы соответствуют поставленным задачам.

Хочется отметить внушительный объём работы проделанной автором. Количество и уровень публикаций, в которых представлены результаты диссертации, говорят о высоком методическом уровне, а также о большой работоспособности Валерии Сергеевны.

В целом данная диссертационная работа выполнена на высоком уровне и хорошо написана, однако есть незначительные упущения и опiski. Например:

1. В автореферате на странице 10 приводится ссылка на рисунок 9Г. Однако рисунка с таким номером в автореферате не содержится, вместо него должна быть ссылка на рисунок 2Г.
2. В автореферате на 6 странице 4 строчка сверху следовало написать «100 страницах» вместо «100 странице». В тексте диссертации на странице 13 строчки 12 и 13 снизу лишние слова «protein»; кроме этого, не дописано предложение на странице 14, 5 строчка снизу, а на 4 строчке снизу название гена не

выделено курсивом. Не все ссылки оформлены единообразно, например на стр. 20, 3 строчка сверху и страница 21, 11 строчка сверху. Кроме этого в тексте диссертации пропущено несколько запятых и есть несколько лишних пробелов в словах.

3. При первом упоминании латинского названия вида следует приводить его полностью (страница 7, строчка 5), что отсутствует при первом упоминании в тексте диссертации *Arabidopsis thaliana*.
4. Качество рисунков не везде хорошее, например, резкость недостаточна на рисунке 1Б, 9Б, 11Г, 18А. Кроме этого, обозначения частей рисунка «В» и «Г» в рисунке 9 следовало перенести на следующую страницу, где расположены сами рисунки. Для окрашивания разных столбцов в графиках лучше было бы использовать разную штриховку, а не оттенки серого.
5. В главе 2.5 отсутствует описание сроков воздействия абиотических стрессов на трансгенные клеточные линии.
6. Глава «Результаты» начинается с повторения на страницу того, что было помещено в раздел «Материалы и методы». Вместо этого на мой взгляд следовало привести в тексте диссертации результаты ПЦР, доказывающие вставку генетических конструкций и отсутствие примеси клеток агробактерий.
7. В главе «Материалы и методы» отсутствует описание процедуры измерения накопления сырой биомассы трансгенными клеточными линиями *V. amurensis*.
8. Стр. 57 «Результаты проведенных экспериментов при солевом стрессе показали, что выживаемость всех трансгенных линий арабидопсиса (07-1, 07-3 и 07-10), сверхэкспрессирующих ген *VaCDPK21*, была выше выживаемости КА0 (рис. 14Б).». Я не согласна с автором – уровень выживаемости линии 07-10 на уровне контроля согласно приведённому графику.

9. В главе материалы и методы отсутствует ссылка на работу, в которой описано получение каллусной культуры из стебля *V. amurensis*.

Кроме того, при ознакомлении с диссертацией у меня возникло несколько вопросов к автору.

1. По мнению автора, чем можно объяснить данные, представленные на рисунке 1Г: почему при более длительном воздействии (24 часа) водного дефицита, манитола или повышенной температуры уровень экспрессии гена *VaCDPK29* снижается до уровня контроля?
2. Полностью ли автор описал условия амплификации в разделе 2.4 диссертации или он действовал по описанному протоколу? Кроме этого, из теста диссертации непонятно производил ли автор секвенирование полученных ампликонов на каком-либо из этапов работы.
3. Почему данные на рисунке 9А и данные для контролей на рисунке 9Б и 9В различаются?
4. Почему были выбраны именно такие сроки воздействия для изучения влияния температурных стрессов на арабидопсис (3.5 часа при +45°C для изучения теплового стресса и 1.5 часа при -10°C для изучения холодного стресса)? Чем вызваны различные сроки воздействия низких и высоких температур?
5. Насколько гены семейства CDPK гомологичны между собой у *V. amurensis*?

Все эти замечания ни в коей мере не умаляют безусловных достоинств работы. Обсуждение результатов отвечает поставленным задачам. Огромный массив данных был грамотно статистически обработан автором, что позволило сделать выводы роли генов *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*,

*VaCDPK26* и *VaCDPK29* в устойчивости дикорастущего винограда *Vitis amurensis* к различным абиотическим стрессам.

### Заключение

Диссертационная работа «РОЛЬ ГЕНОВ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМЫХ ПРОТЕИНКИНАЗ *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* В УСТОЙЧИВОСТИ ВИНОГРАДА *VITIS AMURENSIS* RUPR. К АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ» представляет собой законченное научное исследование. По актуальности темы, степени обоснованности выводов, достоверности и новизне результатов, их значимости для научной и практической деятельности данная работа соответствует основным требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Христенко Валерия Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнология).

14 мая 2018 г.

Научный сотрудник Лаборатории клеточных технологий  
Федерального Государственного Бюджетного учреждения науки  
«Национального научного центра морской биологии»

Дальневосточного научного центра Российской академии наук,  
Кандидат биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная  
биология, цитология, гистология


 Юлия Олеговна Кипрюшина

690041, Владивосток, Пальчевского 17.

(423) 2311161, e-mail: [yulia.kipryushina@gmail.com](mailto:yulia.kipryushina@gmail.com)

Подпись Ю. О. Кипрюшиной заверяю:

Ученый секретарь ИИЦМБ ДВО РАН,

  
В.Е. Жуков



## 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	Кипрюшина Юлия Олеговна
Ученая степень, наименование научной специальности и отрасли науки, по которым защищена диссертация; ученое звание (при наличии)	03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, ученого звания нет
Полное и сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом, являющейся основным местом работы	<i>Полное:</i> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Национальный научный центр морской биологии" Дальневосточного отделения Российской академии наук <i>Сокращенное:</i> ННЦМБ ДВО РАН
Структурное подразделение, должность	лаборатория клеточных технологий, к.б.н., н.с.
Почтовый индекс, адрес организации	690041, Россия, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17
Веб сайт	<a href="http://www.imb.dvo.ru/index.htm">http://www.imb.dvo.ru/index.htm</a>
Телефон	89147293625
Адрес электронной почты	yulia.kipryushina@gmail.com
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Manzhulo I.V., Ogurtsova O.S., <b>Kipryushina Y.O.</b>, Latyshev N.A., Kasyanov S.P., Dyuizen I.V., Tyrtysnaia A.A. Neuron-astrocyte interactions in spinal cord dorsal horn in neuropathic pain development and docosahexaenoic acid therapy // <i>J. Neuroimmunol.</i> 2016. 298. P. 90-7. doi: 10.1016/j.jneuroim</li> <li>2. Boroda A.V., <b>Kipryushina Y.O.</b>, Yakovlev K.V., Odintsova N.A. The contribution of apoptosis and necrosis in freezing injury of sea urchin embryonic cells // <i>Cryobiology.</i> 2016. 73(1). P. 7-14. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.06.007</li> <li>3. <b>Kipryushina Y.O.</b>, Yakovlev K.V., Odintsova N.A. Vascular endothelial growth factors: A comparison between invertebrates and vertebrates // <i>Cytokine Growth Factor Rev.</i> 2015. 26(6). P. 687-695. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.04.001</li> <li>4. Odintsova N.A., Ageenko N.V., <b>Kipryushina Y.O.</b>, Maiorova M.A., Boroda A.V. Freezing tolerance of sea urchin embryonic cells: Differentiation commitment and cytoskeletal disturbances in culture // <i>Cryobiology.</i> 2015. 71(1). P. 54-63. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.06.002</li> <li>5. <b>Kipryushina Y.O.</b>, Yakovlev K.V., Kulakova M.A., Odintsova N.A. Expression pattern of vascular endothelial growth factor 2 during sea urchin development // <i>Gene Expr Patterns.</i> 2013. 13(8). P. 402-406. doi: 10.1016/j.gep.2013.07.003</li> </ol>