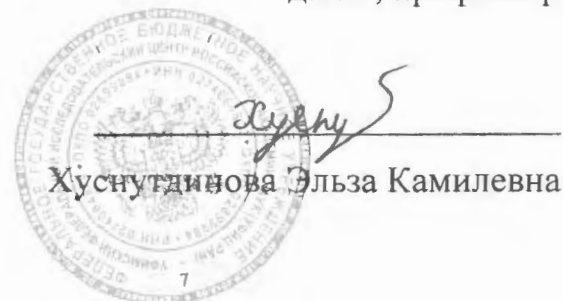


УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБГ УФИЦ РАН
д.б.н., профессор



**Отзыв ведущей организации 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», представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том
числе бионанотехнологии)**

Актуальность темы выполненной работы

Изучение молекулярных механизмов регуляции устойчивости растений к абиотическим факторам среды является одной из наиболее актуальных задач современной физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений. Это связано с тем, что полученные в этой области знания могут быть использованы для создания новых сортов культурных растений с повышенной стрессоустойчивостью, что будет способствовать повышению продуктивности и урожайности растений при выращивании их в неблагоприятных условиях среды. Важную роль в обеспечении устойчивости растений к стрессовым факторам играют кальций-зависимые протеинкиназы. Диссертационная работа Христенко В.С. посвящена изучению роли генов ряда кальций-зависимых протеинкиназ *VaCDPK13*, *VaCDPK20*, *VaCDPK21*, *VaCDPK26* и *VaCDPK29* в обеспечении устойчивости дикорастущего винограда *Vitis amurensis* к абиотическим стрессам. Актуальность данной

работы обуславливается также выбором объекта исследования – амурского винограда, который является одним из наиболее северных видов рода *Vitis* и потому от природы обладающий повышенной стрессоустойчивостью. Исследование данного модельного объекта может способствовать раскрытию сформированных в процессе эволюции генных сетей регуляции стрессоустойчивости у винограда, причем эти знания могут быть экстраполированы и на *Vitis vinifera*. К примеру, изученные в ходе выполнения диссертационной работы гены *CDPK* могут быть использованы в качестве целевых при создании трансгенных растений *V. vinifera*.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации

Научная новизна диссертационной работы заключается в выявлении конкретных генов *VaCDPK*, которые могут быть использованы для повышения устойчивости к специфическим абиотическим стрессовым факторам. Также необходимо отметить, что эти данные впервые доказаны на примере амурского винограда и подтверждены на примере арабидопсиса. Все сформулированные в диссертационной работе выводы характеризуются научной новизной.

Достоверность результатов исследования

Полученные Христенко Валерией Сергеевной научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Это обусловлено адекватностью выбранных методических подходов, правильностью использования этих методов, правильным отбором выборки, систематизацией полученных данных, его статистической обработкой. Работа выполнена на современном методическом уровне. К примеру, положительной стороной работы является то, что для каждой клеточной линии *V. amurensis* проведены исследования экзогенной, эндогенной и суммарной экспрессии изучаемых генов, что дает более полное представление об особенностях каждой линии. Также необходимо отметить, что в работе обоснован выбор референсных генов при анализе уровня экспрессии генов. Основные результаты диссертации опубликованы в

научной печати, в том числе международной и доложены на конференциях. Исследования поддержаны рядом грантовых программ, что также положительно характеризует диссертационную работу. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертационной работы. Убедительно и наглядно представлен собственный материал. Все использованные в работе данные получены самим автором или при непосредственном участии автора, как на этапе постановки цели и задач, разработки методических подходов и их выполнения, так и при проведении исследований, обработке, анализе и обобщении полученных результатов для написания и оформления рукописи.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Научно-практическая значимость работы несомненна, так как затрагивает вопросы выживаемости и повышения продуктивности растений при изменяющихся условиях среды. Исследования в этой области находят применение на практике в области растениеводства и сельского хозяйства. Знания о регуляции стрессоустойчивости будут способствовать разработке стратегии создания хозяйственно-ценных растений с повышенной продуктивностью. Причем полученные в диссертационной работе Христенко В.С. данные могут быть использованы как при создании трансгенных и редактированных растений, так и в классической селекции. Обзор литературы из диссертационной работы может быть рекомендован для студентов для краткого ознакомления с регуляцией стрессоустойчивости у растений.

Общая характеристика работы

Рукопись диссертации изложена на 100 страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав Материалы и методы, Результаты, а также Обсуждение. В диссертационной работе имеется заключение, выводы и список литературы. Иллюстративный материал содержит 9 таблиц и 24 рисунка. Обзор литературы написан довольно кратко и четко и не содержит

лишней информации. В обзоре кратко описаны все основные аспекты молекулярных механизмов устойчивости растений к стрессовым факторам.

Содержание автореферата отражает защищаемые положения диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Для реализации поставленных задач использован большой объем экспериментального материала, проведено множество анализов профиля экспрессии исследуемых генов, а также огромного числа стресс-индуцируемых генов. Более того, в ходе работы были созданы трансгенные клеточные линии амурского винограда и трансгенные растения арабидопсиса. Полученные результаты исследования расширяют представление о роли генов *CDPK* в регуляции стрессоустойчивости.

В целом диссертационное исследование В.С. Христенко заслуживает положительной оценки, так как выполнена большая по объему, трудоемкая, грамотно в научном смысле построенная работа, завершенная важными в научном и практическом отношении результатами.

Вопросы к работе и замечания

В ходе чтения диссертационной работы возник ряд вопросов, некоторые из которых представлены ниже:

1. Во введении пишется, что эксперименты с клеточными линиями винограда амурского и растениями арабидопсиса дают основания экстраполировать результаты на целое растение винограда. Однако никаких аргументов в пользу этого предположения не приводится. Какие есть основания, чтобы делать такие предположения?

2. Почему в положениях выносимых на защиту не отмечено о положительном влиянии сверхэкспрессии гена *VaCDPK29* на рост каллусных культур при действии теплового стресса?

3. Почему использовали довольно сложную процедуру создания генно-инженерных конструкций? К примеру, можно было бы клонировать ампликоны исследуемых генов прямо в заранее подготовленный целевой бинарный вектор, что способствует уменьшению риска появления

однонуклеотидных замен в ДНК трансгенов при многостадийных манипуляциях.

4. Почему использовали такую высокую температуру +45°C для индуцирования теплового стресса у арабидопсиса? Ведь +45°C для арабидопсиса не физиологичная температура, она однозначно летальная при несколько более длительной инкубации, чем применялось в диссертационной работе.

5. Почему для изучения холодоустойчивости использовали столь низкую температуру -10°C. Данная температура больше подходит для изучения морозоустойчивости и она однозначно летальна для арабидопсиса при более длительной инкубации, чем применялось в диссертационной работе.

6. В основе активности протеинкиназ CDPK лежит их способность фосфорилировать различные белки. Каков возможный механизм влияния сверхэкспрессии генов *CDPK* на уровень транскрипции стресс-индуцируемых генов при действии стрессовых факторов?

Замечаний к диссертационной работе довольно мало, некоторые из них представлены ниже:

1. Для α -нафтилуксусной кислоты принято сокращение НУК, а не АНУ.

2. Формулировка положений выносимых на защиту может быть сокращена.

3. Обзор литературы не имеет заключения и не заканчивается приведением информации о необходимости проведения экспериментальных работ по теме диссертации.

4. В главе Материалы и методы необходимо было привести более полную информацию о векторах, использованных в диссертационной работе.

Заключение

Диссертационная работа 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) является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные о роли ряда генов *VaCDPK* амурского винограда в регуляции стрессоустойчивости растений. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а ее автор Христенко Валерия Сергеевна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06. – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв на диссертационную работу Христенко В.С. подготовлен д.б.н. Кулуевым Б.Р., обсужден и утвержден на заседании ученого совета от 18 апреля 2018 года (протокол №3).

Старший научный сотрудник
Института биохимии и генетики – обособленного структурного
подразделения Федерального государственного бюджетного
научного учреждения Уфимского федерального исследовательского
центра Российской академии наук, д.б.н. *03.01.03 - молекулярная биология*
Кулуев Булат Разяпович Кулуев

Адрес: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 71
ibg.anrb.ru, e-mail: molgen@anrb.ru, kuluev@bk.ru
Тел.: +7 (347) 356100, +7 (347) 356088, +79273563156

Подпись Кулуева
Специалист по кадровой работе
ИБГ УФИЦ РАН



О.Б. Сурина

ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН
Входящий № 107
" 17 " 05 20 18 г.

СВЕДЕНИЯ о ведущей организации

по диссертации **Христенко Валерии Сергеевны** 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.

Полное наименование организации в соответствии с Уставом	Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Федерального государственного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с Уставом	ИБГ УФИЦ РАН
Почтовый индекс, адрес организации	450054, г. Уфа, ул. Проспект октября, 71
Веб сайт	ibg.anrb.ru
Телефон	+7 (347) 356100, +7 (347) 356088
Адрес электронной почты	molgen@anrb.ru
Ф.И.О. составителя отзыва	Кулуев Булат Разяпович
Ученая степень, ученое звание, должность и структурное подразделение составителя отзыва	Доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов
Список основных публикаций по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Nurgaleeva E.Z., Knyazev A.V., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. Role of <i>AINTEGUMENTA</i>-like gene <i>NtANTL</i> in the regulation of tobacco organ growth // Journal of Plant Physiology. 2015. V. 189. P. 11-23. 2. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Создание трансгенного рапса (<i>Brassica napus</i> L) с конститутивной экспрессией гена <i>ARGOS-LIKE Arabidopsis thaliana</i> методом погружения цветков // Биотехнология. 2015. №5. С. 49-58. 3. Kuluev B.R., Knyazev A.V., Mikhaylova E.V., Ermoshin A.A., Nikonorov Y.M., Chemeris A.V. The poplar ARGOS-LIKE gene promotes leaf initiation and cell expansion, and controls organ size // Biologia Plantarum. 2016. V. 60. P. 513-522. 4. Kuluev B.R., Avalbaev A.M., Mikhaylova E.V., Nikonorov Y.M., Berezhneva Z.A., Chemeris A.V. Expression profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response // Journal of Plant

- Physiology. 2016. V. 206. P. 1-12.
5. Кулуев Б.Р., Михайлова Е.В., Таипова Р.М., Чемерис А.В. Изменение фенотипа трансгенных растений амаранта *Amaranthus retroflexus* L. с конститутивной экспрессией гена *ARGOS-LIKE* // Генетика. 2016. Т. 52. №12. С. 1388–1397.
6. 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.
7. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Михайлова Е.В., Постригань Б.Н., Князев А.В. Продуктивность и стрессоустойчивость трансгенных растений табака с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтазы рапса *VnGSH* // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. С. 12–19.
8. Бережнева З.А., Кашафутдинова А.Р., Кулуев Б.Р. Рост корней трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. с конститутивной экспрессией гена глутатионсинтазы рапса *VnGSH* при действии стрессовых факторов // Вестник защиты растений. 2017. Т. 93. №3. С. 55–59.
9. Бережнева З.А., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Рост трансгенных растений табака с эстрадиол-индуцибельной экспрессией гена ксилоглюканэндотрансгликозилазы *txet-b2* томата в стрессовых условиях // Генетика. 2018. Том. 54. №4. С. 435-446.
10. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Князев А.В., Никоноров Ю.М., Чемерис А.В. Участие генов ксилоглюканэндотрансгликозилаз *PtrXTH1* и *RnXTH1* в регуляции роста и адаптации растений к стресс-факторам // Физиология растений. 2018. Т. 65, № 1. С. 34–45.
11. Кулуев Б.Р., Бережнева З.А., Михайлова Е.В., Чемерис А.В. Рост трансгенных растений табака с измененной экспрессией генов экспансинов при действии стрессовых факторов // Физиология растений. 2018. Т. 65. №2. С. 121–132.
12. Сельдимирова О.А., Безрукова М.В., Галин

И.Р., Лубянова А.Р., Шакирова Ф.М., Круглова Н.Н. Влияние 24-эпибрассинолида на формирование, ростовые показатели и регенерационную способность каллусов in vitro контрастных по засухоустойчивости сортов пшеницы // Физиология растений. 2017. Т. 64. № 6. С. 461-472.

13. Shakirova F., Allagulova S., Maslennikova D., Fedorova K., Yuldashev R., Lubyanova A., Bezrukova M., Avalbaev A. Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress // Plant Physiology and Biochemistry. 2016. Т. 108. С. 539-548.

14. Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Федорова К.А., Петрова Н.В., Каримова Ф.Г., Шакирова Ф.М. Роль протеомных и фосфотеомных перестроек в проявлении ростстимулирующего действия 24-эпибрассинолида на растения пшеницы // Вестник Башкирского университета. 2015. Т. 20. № 2. С. 449-454.

Верно

Директор ИБГ УФИЦ РАН
доктор биологических наук, проф



Хуснутдинова Э.К.

11.05.2018 г.