

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.19.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 10 июня 2020 г. №18

о присуждении **Тимербаеву Вадиму Рафаиловичу**, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание безмаркерных растений томата и яблони с геном суперсладкого белка» по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология принята к защите 11 марта 2020 г., протокол №11 Диссертационным советом Д 002.19.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, действующим на основании приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2015 года.

Соискатель Тимербаев Вадим Рафаилович 1981 года рождения, в 2004 году окончил Саратовский государственный университет им Н.Г. Чернышевского. С 2005 г. по 2008 г. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук Долгов Сергей Владимирович, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений, главный научный сотрудник Филиала Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель группы функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и **Камионская Анастасия Михайловна**, к.б.н., заместитель директора по научной работе, ведущий научный сотрудник, руководитель группы биоинженерии растений Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук (ФГБУН ИБГ РАН) в своем *положительном* заключении, подписанном Гапоненко Александром Константиновичем, доктором биологических наук, профессором, руководителем группы клеточных и генетических основ развития растений, и утвержденном Васильевым Андреем Валентиновичем, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН, директором ФГБУН ИБГ РАН, указала, что диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича является завершенной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ №842 от 24.09.2013, с изменениями №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г.), а автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 4 работы объемом 5 печ. л., опубликованные в рецензируемых научных изданиях, цитируемых базами данных Web of Science и Scopus. Научные работы по теме диссертации, в которые Тимербаев В.Р. внес основной или существенный вклад:

Timerbaev V.R., Mitiouchkina T.Y., Dolgov S.V. Production of marker-free cisgenic apple plants using inducible site-specific recombinase and a bifunctional selectable gene // Acta Hort. – 2019. – Vol. 1261. – P. 149–156.

Timerbaev V., Dolgov S. Functional characterization of a strong promoter of the early light-inducible protein gene from tomato // Planta. – 2019. – Vol. 250. – P. 1307–1323.

Timerbaev V., Mitiochkina T., Pushin A., Dolgov S. Production of marker-free apple plants expressing the supersweet protein gene driven by plant promoter // *Front Plant Sci.* – 2019. – 10:388. doi:10.3389/fpls.2019.00388.

Timerbaev V., Pushin A., Dolgov S. Production of marker-free tomato plants expressing the supersweet protein thaumatin II gene under the control of predominantly fruit-specific promoters. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2019. – Vol. 139. – P. 621–634.

В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

официального оппонента д.б.н. **Голденковой-Павловой Ирины Васильевны.**

Отзыв положительный, содержит следующие замечания и пожелания:

1) работа только бы выиграла, если в конце раздела «Обзор литературы» **Вадим Рафаилович** привел бы краткое заключение, в котором бы изложил какие вопросы остаются открытыми и какие эксперименты требуются провести;

2) в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы написать: «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала прокариотического происхождения» вместо «Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала, особенно бактериального и вирусного происхождения»; «после удаления нежелательной ДНК» вместо «нежелательного удаления ДНК»; термин «тканеспецифичный» используется наряду с «тканеспецифический», следовало бы придерживаться единообразия и т.д.;

3) вестерн-блот – обозначение на рисунке образцов e1 и e8!!! (рис. 12 в диссертации и рис. 8 – в автореферате). e8-VI-22-6 и e1-XI-14 (на рисунке вместо e8-VI-22-6 и e1-VI-22-6 и вместо e8-VI-22 - e1-VI-22).

Отзыв официального оппонента к.б.н. **Камионской Анастасии Михайловны.**

Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) в диссертационной работе имеются незначительные опечатки и неудачные формулировки или обороты. Так, фраза в обзоре литературы «Недостатком промотора гена *LeACO1* является минорная активность в стареющих листьях, цветках и в местах поранений (Blume and Grierson, 1997)» - несколько неоднозначна, т.к. может говорить о том, что промотор не тканеспецифичен, а с другой стороны, что он обладает слишком низкой эффективностью. Также в абзаце 1 на странице 38 дважды повторяется одно и то

же утверждение;

2) еще одно замечание касается экстраполяции экспериментальных данных о вероятном высоком уровне целевого белка в плодах яблони на основании экспрессии гена тауматина в листьях безмаркерных линий, что кажется несколько преждевременным.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1) в обзоре литературы хотелось бы видеть иллюстративный материал, способствующий лучшему восприятию изложенной информации;

2) на рисунке 1 не переведены на русский язык обозначения размера делеционных вариантов промотора bp на п.н.;

3) в работе имеется некоторое количество опечаток.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и генетической инженерии растений, которые подтверждены публикациями в ведущих российских и международных журналах. Тематика официального оппонента Голденковой-Павловой И.В. касается исследований по изучению физиологической роли генов и вариаций их экспрессии на экспериментальных моделях растений. Она также занимается разработкой методов анализа экспрессии наследования и функционального проявления гетерологичных генов у растений, методов генной и белковой инженерии, подходов к созданию рекомбинантных ферментов в целях развития биотехнологии. Тематика официального оппонента Камионской А.М. касается изучения наследования и проявления перенесенных генов в поколениях биотехнологических растений, изучения взаимодействия растение-патоген и оценки устойчивости биотехнологических растений к фитопатогенам и различным стрессовым факторам. Коллектив ведущей организации разрабатывал методы генетической трансформации пшеницы, подсолнечника, сахарной свеклы, занимается изучением клеточных и генетических основ биологии развития и биотехнологии растений, регуляции морфогенеза *in vitro* у важнейших продовольственных культур РФ, созданием методами генетической инженерии сортов пшеницы и подсолнечника, устойчивых к неблагоприятным факторам среды. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает новизну результатов, полученных соискателем. Впервые клонирован и охарактеризован промотор гена раннего светоиндуцибельного белка (*ELIP*) томата, этот промотор успешно был использован для целевой наработки белка в плодах томата и обеспечил очень высокий уровень экспрессии. Впервые получены безмаркерные растения томата и яблони, экспрессирующие ген суперсладкого белка тауматина под контролем преимущественно плодоспецифичных промоторов. Растения при этом не содержат генетических элементов нерастительного происхождения.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что выявленные общие мотивы в последовательностях плодоспецифичных промоторов (включая *ELIP*), возможно, позволят в дальнейших исследованиях идентифицировать новые регуляторные цис-элементы. Представленные результаты работы расширяют представления о взаимосвязи между структурой и функцией промоторных регионов генов растений. Полученные при разработке протоколов данные позволили выявить тонкие методологические особенности системы отбора безмаркерных растений, что позволит в будущем планировать и проводить эксперименты с большей эффективностью.

Практическая значимость исследования обоснована тем, что для нужд биотехнологии растений определен размер промоторного участка гена *ELIP*, который обеспечивает высокий уровень экспрессии гетерологичного гена в плодах томата, описанный промотор *ELIP* может быть использован для обеспечения высокого уровня экспрессии целевых генов в плодах томата и других видов плодовых культур, а также для производства различных белков и пищевых вакцин в растениях. Растения томата с высоким уровнем накопления суперсладкого белка потенциально могут быть растительными продуцентами белка тауматина II. Определены недостатки R/Rs системы рекомбинации, ограничения при ее применении для получения безмаркерных растений томата и яблони. Предложены способы оптимизации экспериментальных условий для повышения эффективности удаления нежелательной ДНК из генома растений и селекции. Также в работе представлены методические рекомендации по созданию безмаркерных растений с использованием системы *rMF1*.

Достоверность полученных результатов исследования не вызывает сомнений: эксперименты были проведены с использованием современного сертифицированного оборудования, а собранные данные обработаны с применением соответствующих методов статистического анализа. Все необходимые контрольные эксперименты были

проведены. Установлено количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и выполнении экспериментов, обработке полученных данных и обобщении результатов. Все результаты, представленные в диссертационной работе получены лично Тимербаевым В.Р., за исключением получения первичных трансгенных линий яблони (получены Митюшкиной Т.Ю.), Саузерн- и вестерн-блоттингов и ИФА (выполнены Пушиным А.С.). Автор лично представлял результаты на российских и международных конференциях, а также написал и подготовил к печати публикации, включающие основные результаты, представленные в работе.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Тимербаева В.Р. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют важное значение для развития молекулярной биологии растений. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Тимербаева Вадима Рафаиловича соответствует всем требованиям (в том числе п. 9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 10 июня 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Тимербаеву Вадиму Рафаиловичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 23, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель диссертационного совета,
академик РАН, д.х.н.



Иванов В.Т.

Ученый секретарь диссертационного совета,
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.

11 июня 2020 г.